

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Interacciones entre ácido desoxirribonucleico y la
membrana plasmática durante el estado de competencia de
Bacillus subtilis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Paloma López García

DIRECTOR:

Manuel Espinosa

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306072208

T 579.25
LOP
int

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCIONES ENTRE ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
Y LA MEMBRANA PLASMATICA DURANTE EL ESTADO DE
COMPETENCIA DE BACILLUS SUBTILIS.

TESIS QUE PARA ASPIRAR AL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS, PRESENTA,



R. 23.154

PALOMA LOPEZ GARCIA

MADRID, JUNIO 1978



Quiero dar las gracias en primer lugar al Dr. Manuel Espinosa, quién con su experiencia y valiosas enseñanzas, me ha prestado una ayuda inestimable en la preparación de esta Tesis que no hubiera podido realizar sin su constante apoyo y continuos desvelos, a los cuales sólo puedo corresponder con mi reconocimiento y sincero cariño.

Asimismo quiero expresar mi gratitud al Prof. D. Antonio Portolés, Director del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana que en todo momento me ha demostrado un afectuoso interés y ha puesto a mi disposición los medios materiales para poder llevar a cabo este trabajo.

También deseo agradecer su colaboración a mis compañeros M^a. Teresa Pérez Ureña y Ernesto García que, con su solicitud y apoyo, me han servido de estímulo para la realización de esta Tesis.

Igualmente, quiero dar las gracias a M^a. Teresa Alda y M^a. Luisa del Pozo por su labor de asistencia técnica, a M^a. del Carmen Ascaso por su ayuda y colaboración en la Microscopía Electrónica y a Aurelio Hurtado por haber realizado los dibujos de esta Tesis.

Finalmente hago extensivo mi agradecimiento al Prof. D. Dimas Fernandez Galiano por aceptar el patrocinio de esta Tesis.

I N D I C E

pags.

INTRODUCCION	1
------------------------	---

PARTE BIBLIOGRAFICA

I. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TRANSFORMACION BACTERIANA	3
II. EL ESTADO DE COMPETENCIA	8
A.- Definición de la competencia	8
B.- Desarrollo de la competencia	9
C.- Fisiología de la competencia	12
D.- Factores de competencia	17
E.- La competencia y el proceso de esporulación	24
III. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS CELULAS COMPETENTES	31
A.- Propiedades morfológicas de las células competentes	31
1. Tamaño celular	31
2. Contenido en cuerpos nucleares	32
3. Estructuras mesosómicas	33
B.- Propiedades fisicoquímicas	34
1. Densidad de las células.	34
2. Composición de la pared celular	37
3. Carga eléctrica de la pared celular	40

C.- Propiedades metabólicas	41
1. Situación del DNA en las células competentes.	41
2. Síntesis de RNA y proteínas en las células competentes	45
3. Síntesis de pared	48
4. Actividad autolítica	49
5. Termorresistencia	50
6. Unión de proteínas a células competentes .	51
IV. EL PROCESO DE TRANSFORMACION BACTERIANA	53
A.- Características del material genético	53
1. Tamaño del DNA donador	54
2. Conformación del DNA transformante	57
3. El ácido ribonucleico como molécula donadora.	58
4. Incorporación de polinucleótidos sintéticos.	60
B.- Etapas del proceso de transformación	60
1. Adsorción	62
2. Penetración	63
3. Destino del DNA transformante después de la penetración	64
a) Eclipse	64
b) Integración	68
c) Estudios genéticos de la integración . .	78
4. Expresión fenotípica	80

V. TRANSFORMACION HETEROESPECIFICA Y TRANSFECCION . .	84
A.- Transformación heteroespecífica	84
B.- Transfección	90
VI. MECANISMOS DE INCORPORACION DEL DNA TRANSFORMANTE.	95
A.- Unión del DNA a las células competentes . . .	95
1. Receptores	96
2. Autolisinas	99
3. Interacción entre DNA y superficie celular.	102
B.- Penetración del DNA en el interior de las células receptoras	104
1. Acción de las nucleasas en la penetración .	104
2. Modelos de unión y penetración	111
VII. INTERACCIONES ENTRE DNA Y ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS.	114
A.- Asociación entre DNA y membrana <u>in vivo</u> . . .	114
B.- Asociación entre DNA y membrana <u>in vitro</u> . . .	119
1. Interacción entre DNA y complejos pared-membrana	119
2. Asociación entre DNA y mesosomas	121
3. Asociación entre DNA y vesículas membranosas.	125
VIII. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	129

PARTE EXPERIMENTAL

I. MATERIAL Y METODOS	131
---------------------------------	-----

A.- Material y medios de cultivo	131
1. Estirpes bacterianas y bacteriófagos . .	131
2. Medios de cultivo	131
3. Soluciones	136
4. Reactivos	137
B.- Técnicas	138
1. Obtención de DNA bacteriano	138
2. Purificación de bacteriófagos	140
3. Extracción de los DNAs fágicos	145
4. Determinación de DNA, RNA y proteínas . .	146
5. Curvas de crecimiento	147
6. Métodos de puesta en competencia	148
7. Procedimiento de transformación	150
8. Cálculo del número de células viables y transformantes	150
9. Determinación de radioactividad	151
10. Unión e incorporación de DNA a las células.	152
11. Aislamiento de protoplastos y unión de DNA a dichas estructuras	153
12. Aislamiento de complejos pared-membrana, pa- redes y su unión con el DNA	154
13. Aislamiento de vesículas membranosas y unión del DNA a éstas	155
14. Gradientes continuos de sacarosa	157
15. Determinación de exonucleasas	158

16. Técnicas de competición	159
17. Técnicas de caza	160

RESULTADOS

II. ESTUDIO DEL SISTEMA BIOLOGICO	151
1. Desarrollo de la competencia empleando distintos métodos	161
2. Modificaciones experimentales al método de competencia	167
III. ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE DNA HOMOLOGO Y CELULAS COMPETENTES	170
1. Efecto de cationes divalentes en el de- sarrollo de la competencia	170
2. Papel del calcio en la transformación de <u>B. subtilis</u>	171
3. Efecto del etilén-diamino-tetraacetato (EDTA) en el proceso de transformación.	173
4. Papel del magnesio en la expresión, unión y penetración del DNA transformante	181
IV. ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE DNA HOMOLOGO Y PRO- TOPLASTOS	192
1. Unión de DNA a protoplastos	192
2. Características del DNA expuesto a proto- plastos	194
3. Accesibilidad a la DNasa I del DNA unido a protoplastos	198
V. ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE DNA HOMOLOGO Y ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS	201
1. Unión de DNA a complejos pared-membrana	201
2. Unión de DNA a paredes	203
3. Unión de DNA a vesículas membranosas	205

VI. INTERACCIONES ENTRE DNAs HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS Y LA PERIFERIA CELULAR	213
1. Estudio de la capacidad de unión de incor- poración de DNAs de distintos orígenes en células	213
2. Estudio de la unión de DNAs de diferentes orígenes a protoplastos	223
3. Estudio de la unión de diversos DNAs a ve- sículas membranosas	233
VII. DISCUSION	241
1. Condiciones óptimas para el desarrollo de la competencia	241
2. Efecto del EDTA en los procesos de transmi- sión de información genética	243
3. Interacción entre DNA homólogo y membrana plasmática	250
4. Asociación entre DNAs de distintos orígenes y estructuras periféricas celulares	255
VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES	262
IX. BIBLIOGRAFIA	269

INTRODUCCION

A medida que el campo de la Genética Molecular se ha ido desarrollando, ha ido ganando en importancia el papel que los mecanismos de intercambio de material genético entre los seres vivos juega en todos los procesos vitales.

Los organismos procarióticos han permitido un acercamiento al complejo problema de la transmisión de la información genética. En efecto, los microorganismos constituyen un sistema relativamente simple, dentro de su cada día mas evidente complejidad, que facilita la aproximación experimental a fenómenos que, en otras condiciones, hubieran retrasado notablemente el avance de esta rama de la Ciencia.

Uno de estos mecanismos, la transformación bacteriana, constituye la forma más directa de abordar la problemática de la transmisión de información genética, puesto que se ocupa de estudiar la interacción entre moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) purificadas y microorganismos receptores. Los mecanismos implicados en tales interacciones son lo suficientemente desconocidos como para que atrajeran nuestra atención, dado que plantean los interrogantes de cómo y por qué el DNA transformante es incorporado por las células de un cultivo bacteriano. En esta dirección hemos enfocado nuestra labor experi-

mental. Previamente, parece necesario realizar una revisión bibliográfica que permita conocer el estado actual de los conocimientos en el campo de la transformación bacteriana.

P A R T E

B I B L I O G R A F I C A

I. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TRANSFORMACION BACTERIANA.

La transformación bacteriana, como ya es sabido, es un proceso biológico en el cual se produce la transferencia de una molécula de ácido deoxirribonucleico (DNA) exógeno, presente en el medio, a una célula receptora. Dicho material genético, después de penetrar en la célula huésped, es incorporado en el genoma receptor produciéndose finalmente la expresión fenotípica de la información genética transferida (BRAUN, 1965; ERICKSON, 1970).

El proceso de transformación fué detectado por primera vez en 1928 por el bacteriólogo inglés FRED GRIFFITH en la bacteria Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae, agente productor de la neumonía. Dicho autor observó que pneumococos de una estirpe virulenta, muertos por calentamiento, al ser inyectados en un ratón, junto con una cepa no virulenta de pneumococos, producía la muerte del roedor. Además, gran cantidad de bacterias virulentas vivas podían ser aisladas de los cuerpos de los ratones. Este fenómeno no era producido por una "vuelta a la vida" de las bacterias muertas por calentamiento. GRIFFITH mostró que alguna sustancia de las bacterias muertas había "transformado" a las células no virulentas convirtiéndolas en virulentas.

Hasta 1944 no se descubrió la naturaleza del material transferido. AVERY, MacLEOD y McCARTY , identificaron la sustancia transformante como DNA. Ya se sabía entonces que el DNA era el principal componente de los cromosomas de las células de organismos superiores.

AVERY y sus colegas utilizaron la transformación como una técnica con la cual investigar el papel del DNA en la herencia. Por ejemplo, se puede extraer el DNA de células rotas a partir de una estirpe mutante de pneumococos, que puede sobrevivir y multiplicarse en presencia de estreptomycin y entonces añadir el DNA a un cultivo de una estirpe que es sensible al antibiótico. A veces, nada sucede. Sin embargo, otras veces un trozo de una molécula gigante de DNA penetra en el interior de una célula de una estirpe sensible a la estreptomycin. Dicho DNA llega a ser una parte integral del cromosoma de la célula receptora. Si el segmento incluye la secuencia de unidades de DNA que codifica la propiedad de resistencia a estreptomycin, la célula recipiente es capaz de sobrevivir y multiplicarse en presencia de dicho antibiótico. Lo más importante de este fenómeno es que la resistencia al antibiótico llega a ser permanente, una propiedad hereditaria de las células que puede pasar a su descendencia. Mediante este proceso, pueden introducirse diversas propiedades hereditarias en cultivos bacterianos. Por lo tanto, la transformación es una herramienta útil para introducir cambios en el material hereditario de una célula bacteriana viva.

Parece probable que la bacteria pueda practicar esta clase de ingeniería genética por sí misma.

Si se cultivan juntas dos estirpes de pneumococos que difieren en un número de propiedades, las bacterias sufren un intercambio espontáneo bilateral de genes. Las células de una estirpe son transformadas por DNA liberado al medio por la otra estirpe. No se sabe si este DNA es excretado por células vivas o si procede de los cromosomas bacterianos liberados después de la muerte celular.

El proceso transformante ha sido estudiado en numerosas especies, pero sólo en un pequeño grupo ha dado resultado positivo. Entre ellos, merece destacarse Bacillus subtilis (VENEMA y cols. 1965), S. pneumoniae (FOX y ALLEN, 1964), Haemophilus influenzae (KOOISTRA y VENEMA, 1967; NOTANI y GOODGAL, 1966), Streptococcus (PAKULA y cols, 1962), Staphilococcus (SJÖSTROM y cols., 1972). Además de las bacterias Gram-positivas es posible encontrar procesos de transformación en bacterias gram-negativas como en Escherichia coli (OISHI y COSLOY, 1972) pero, en muchos casos, es necesario someter los cultivos a condiciones drásticas para que las células puedan incorporar el DNA. En el Cuadro I se indican algunos de los microorganismos en los que se ha conseguido la transformación.

Para que la transformación ocurra es necesario que las células bacterianas se encuentren en un estado fisiológico especial denominado estado de competencia (McCARTY y cols., 1946).

Las bases de la transformación y de la competencia han sido extensamente revisadas (ERICKSON, 1970; HOTCHKISS y GABOR, 1970; NOTANI y SETLOW, 1974; SPIZIZEN y cols. 1966; TOMASZ, 1969, 1973 b).

CUADRO I: Sistemas de transformación más comunes en organismos procarióticos (*)

Eubacterias		Otros
Gram-positivas	Gram-negativas	
<u>Bacillus</u> (B. subtilis; B.cereus; B. stearothermophilus y otras especies <u>Streptococcus</u> (S. sanguis; <u>S. pneumoniae</u>) <u>Staphylococcus</u> (St. aureus) <u>Micrococcus</u> (M. lysodeikticus; M. radiodurans; otras especies)	<u>Klebsiella</u> <u>Pasteurella</u> <u>Haemophilus</u> (H. influenzae; H. parainfluenzae) <u>Proteus</u> <u>Escherichia</u> (E. coli) <u>Pseudomonas</u> (Ps.aeruginosa; Ps. fluorescens) <u>Salmonella</u> <u>Shigella</u> <u>Brucella</u> <u>Azotobacter</u> (A. vinelandii; A. chroococcum) <u>Rhizobium</u> <u>Agrobacterium</u> (A.tumefaciens) <u>Moraxella</u> <u>Neisseria</u> (N. catarrhalis; N. gonorrhoeae; N.meningitidis)	<u>Mycoplasma</u> (M. laidlawii) <u>Thermoactinomyces</u> (Th. vul- garis) <u>Acinetobacter</u> (A. calcoace- ticus) <u>Actinomyces</u> <u>Allomyces</u> <u>Leptospira</u>

(*) según PORTOLES Y cols.(1977b) Y NOTANI Y SETLOW (1974)

En esta introducción bibliográfica se describirán las características del proceso de transformación en algunos de los distintos sistemas antes citados, si bien centraremos el estudio en el sistema de transformación de B. subtilis, el cual hemos empleado para nuestras experiencias.

II. EL ESTADO DE COMPETENCIA

Para poder estudiar los procesos implicados en la transformación bacteriana es necesario hacer una revisión sobre la fisiología de las células receptoras y su capacidad para desarrollar el estado de competencia en los distintos sistemas bacterianos.

A.- DEFINICION DE LA COMPETENCIA

El término competencia es bastante ambiguo ya que, en los primeros estudios realizados sobre dicho tema, era empleado refiriéndose a la capacidad de las células receptoras para ser genéticamente transformadas (TOMASZ, 1966; PERRY y SLADE, 1966), suponiendo que el número de transformantes era proporcional a la cantidad de DNA incorporado por las células receptoras (ZAMENHOF, 1957; GOODGAL y HERRIOT, 1957; SCHAEFFER, 1958). Posteriormente, se descubrieron mutantes (rec⁻) que incorporaban DNA exógeno aunque eran incapaces de integrar dicho DNA en su genoma, debido a que tenían bloqueado el proceso de recombinación (FOLSOME, 1968; GERMAINE y ANDERSON, 1966).

Este hecho sirvió para considerar que la competencia es un estado fisiológico, independiente de la transformación, que posee la totalidad o una parte de la población bacteriana, y que capacita a las células para incorporar material genético exógeno presente en el medio (TOMASZ, 1969; POSTEL y GOODGAL, 1972).

B.- DESARROLLO DE LA COMPETENCIA

Una de las características fundamentales del estado de competencia es el hecho de que este estado es transitorio durante el ciclo de desarrollo de los cultivos bacterianos.

El desarrollo de la competencia en el sistema de B. subtilis está restringido a una pequeña fracción del total de la población celular, ya que en el máximo de competencia (alcanzado al final de la fase de crecimiento exponencial) solamente del 10-20% de las células son competentes (VERMEULEN y VENEMA, 1971).

Se ha dicho, incluso, que la competencia en el sistema de B. subtilis es un estado patológico (TOMASZ, comunicación personal) ya que en otros sistemas la mayor parte de la población es competente. Así, en el sistema de S. pneumoniae el 90% de las células de la población son competentes.

Asimismo, basándose en el hecho de que las células competentes son más sensibles a los rayos ultravioletas que las no competentes, se ha podido comprobar que, en el sistema de H. influenzae, solamente el 4% de las células son incapaces de alcanzar la competencia. En la mayor parte de los sistemas transformantes más comunes, el estado de competencia parece ser una etapa por la que pasan los cultivos celulares dentro de su ciclo de desarrollo.

Sin embargo, en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, la mayor complejidad de su pared dificulta el desarrollo de la competencia. De este modo, en el sistema de E. coli, para que las células sean capaces de incorporar DNA exógeno es necesario someter a la superficie celular a un tratamiento artificial con el fin de aumentar su permeabilidad. Entre los procedimientos empleados destaca la formación de esferoplastos con lisozima y etilén-diaminotetraacetato (EDTA) (GUTHRIE y SINSHEIMER, 1960) que facilita la unión de DNA procedente de bacteriófagos. También se ha empleado la infección previa con fago λ para lograr la transformación (KAISER y HOGNESS, 1960). No obstante, el procedimiento que ha resultado ser más efectivo ha sido el someter a los cultivos a un tratamiento con calcio, realizado en dos fases: en la primera, el cultivo se incuba con CaCl_2 a 0°C y después, en una segunda etapa, se prosigue la incubación a 37°C en presencia del DNA donador (COSLOY y OISHI, 1973). No se conoce el mecanismo por el cual el CaCl_2 facilita la incorporación del DNA, si bien se han sugerido varias posibilidades (OISHI e IRBE, 1977):

a) Podría ser que el CaCl_2 neutralizara la carga negativa de la superficie celular haciendo accesible el DNA a la membrana celular.

b) El Ca^{2+} podría producir una desnaturalización de proteínas de la membrana, ya que dicho catión, a concentraciones elevadas, actúa como agente desnaturalizante de algunas proteínas.

c) Finalmente el Ca^{2+} podría activar algún enzima que modifique la estructura de la membrana haciéndola permeable al DNA.

La competencia puede ser considerada como un fenómeno de todo o nada respecto a una determinada célula de la población bacteriana, ya que una célula es no competente (carece de capacidad para incorporar DNA), o es competente con capacidad para

incorporar DNA (VERMEULEN y VENEMA, 1971). Aunque la transición de no competente a competente es muy drástica, es necesario que una célula sufra una serie de cambios celulares antes de alcanzar su estado competente. DOOLEY y cols. (1971) estudiaron detalladamente este proceso en el sistema de B. subtilis, comprobando que las células cultivadas en un régimen que conduce a la competencia pasan por un estado llamado precompetente que dura aproximadamente 1,5 horas antes de que lleguen a ser transformables.

Durante este estado las células se apartan de su normal crecimiento vegetativo, no conociéndose cuáles son los mecanismos que lo regulan.

Dentro del estado precompetente cabe distinguir cinco estadios:

a) En la primera etapa que tiene lugar para desarrollarse la competencia, se produce una disminución de la síntesis de DNA y de la relación síntesis RNA/proteínas. Estos cambios están, probablemente, causados por una disminución en la tasa de crecimiento, o bien pueden ser un reflejo de dicha disminución. Las células no competentes que han entrado en esta etapa pueden ser denominadas, "precompetentes" y continúan dividiéndose durante 3 ó 4 generaciones más.

b) La segunda fase se denomina precompetencia irreversible. Ocurre cuando los cambios fisiológicos asociados con el estado precompetente han llegado a un punto en el que es imposible que las células vuelvan al crecimiento normal. Esta fase es defini-

da como el período en el que no se puede evitar la aparición de la competencia por dilución en medio fresco, como ocurría en la fase anterior.

c) Las células precompetentes adquieren una menor densidad de flotación, lo que es probablemente una expresión de cambios macromoleculares. La menor densidad es un prerrequisito para la competencia, pero es insuficiente en sí misma. Basado en esta propiedad de las células competentes, es posible separarlas del resto de la población empleando la centrifugación en gradientes de densidad.

d) Seguidamente hay una rápida conversión de células precompetentes en competentes pudiendo ser transformadas y poseyendo todas las propiedades del estado competente.

e) La fase final puede ser definida como la etapa de desaparición de la competencia. La duración precisa del estado de competencia depende del criterio y medio empleado para su desarrollo.

C.- FISIOLOGÍA DE LA COMPETENCIA

La aparición de la competencia lleva consigo una alteración de las propiedades fisiológicas de las bacterias, dirigiendo de un sistema bacteriano a otro.

En los sistemas de transformación de H. influenzae y B. subtilis el desarrollo de la competencia va ligado a grandes cambios en la fisiología celular, produciéndose una latencia biosintética. Esto es lógico, ya que en dichos sistemas la

competencia aparece al final de la fase exponencial, o bien, cuando se cambia el cultivo de un medio rico a un medio pobre o por una disminución del oxígeno en el medio de cultivo (SPENCER y HERRIOTT, 1965, ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961). En el sistema de S. pneumoniae, la competencia se alcanza durante un período particular del crecimiento exponencial, no mostrando propiedades fisiológicas específicas (TOMASZ, 1966, 1968). En otros sistemas, sin embargo, la competencia no está asociada con un estado particular del crecimiento, como por ejemplo en Neisseria (CATLIN, 1960) y en Micrococcus radiodurans (MOSELEY y SETLOW, 1968), o puede estar asociado con un estado de crecimiento totalmente distinto, como en el sistema de Streptococcus sanguis, el cual exhibe un máximo de competencia al principio del crecimiento exponencial (PERRY y SLADE, 1963). Algunas bacterias como la estirpe Wicky, de S. sanguis, sólo puede llegar a ser competente cuando se añade material extracelular procedente de estirpes competentes al medio de cultivo (PAKULA y cols. 1963). Todas estas observaciones muestran que la competencia es un estado complejo, y puede ser diferente en los diferentes tipos de bacterias.

El desarrollo de la competencia y el valor máximo de ésta dependen de la composición del medio empleado, ya que existen sustancias que son capaces de estimular o inhibir la competencia. En cuanto al contenido en sales del medio, se sabe que es necesaria la presencia de cationes para que se produzca el proceso de transformación. Los cationes divalentes que se requieren son: bario, calcio, estroncio o magnesio a una concentración de $5 \times 10^{-3} M$, mientras que la presencia de otros cationes mono o divalentes, no parecen afectar a este proceso (YOUNG y SPIZIZEN, 1961). Por otra parte, BOTT y WILSON (1968) comprobaron que la

presencia de hierro y manganeso en los medios de cultivo provocaba una desaparición de la competencia en el sistema de B. subtilis.

En los sistemas de S. pneumoniae, B. subtilis y H. influenzae la síntesis de proteínas, pero no la de DNA, es esencial para el desarrollo de la competencia, de modo que algunos de los inhibidores de la síntesis de RNA pueden suprimir la competencia, debido a que se impide la síntesis de proteínas.

Entre las sustancias inhibitorias de la competencia se encuentran ciertos aminoácidos, los cuales difieren de unos sistemas a otros. Por ejemplo, la valina que inhibe la competencia en H. influenzae, estimula en B. subtilis y S. pneumoniae, y la alanina y ácido glutámico son inhibidores del desarrollo de la competencia en B. subtilis pero no en H. influenzae. De igual forma, la leucina y la isoleucina poseen efectos opuestos en el sistema de B. subtilis y de S. pneumoniae.

El distinto efecto de los aminoácidos no sólo se manifiesta al comparar un sistema de transformación con otro, ya que algunos de ellos muestran un comportamiento diferencial dentro de un mismo sistema de transformación. Así, por ejemplo, en el sistema de B. subtilis, cuando los cultivos son puestos en competencia en quimostato se han comprobado distintos efectos de algunos aminoácidos para diferentes tiempos de duplicación. LOPEZ y cols. (1975) han observado que la arginina y la histidina son inhibidores de la competencia para un tiempo de duplicación de 2,5 h mientras que provocan una estimulación para tiempo de duplicación de 6,5 h (Fig. 1). Efectos opuestos se han encontrado para el ácido glutámico y la alanina. Además, se ha comprobado, en estos mismos estudios, que los aminoácidos

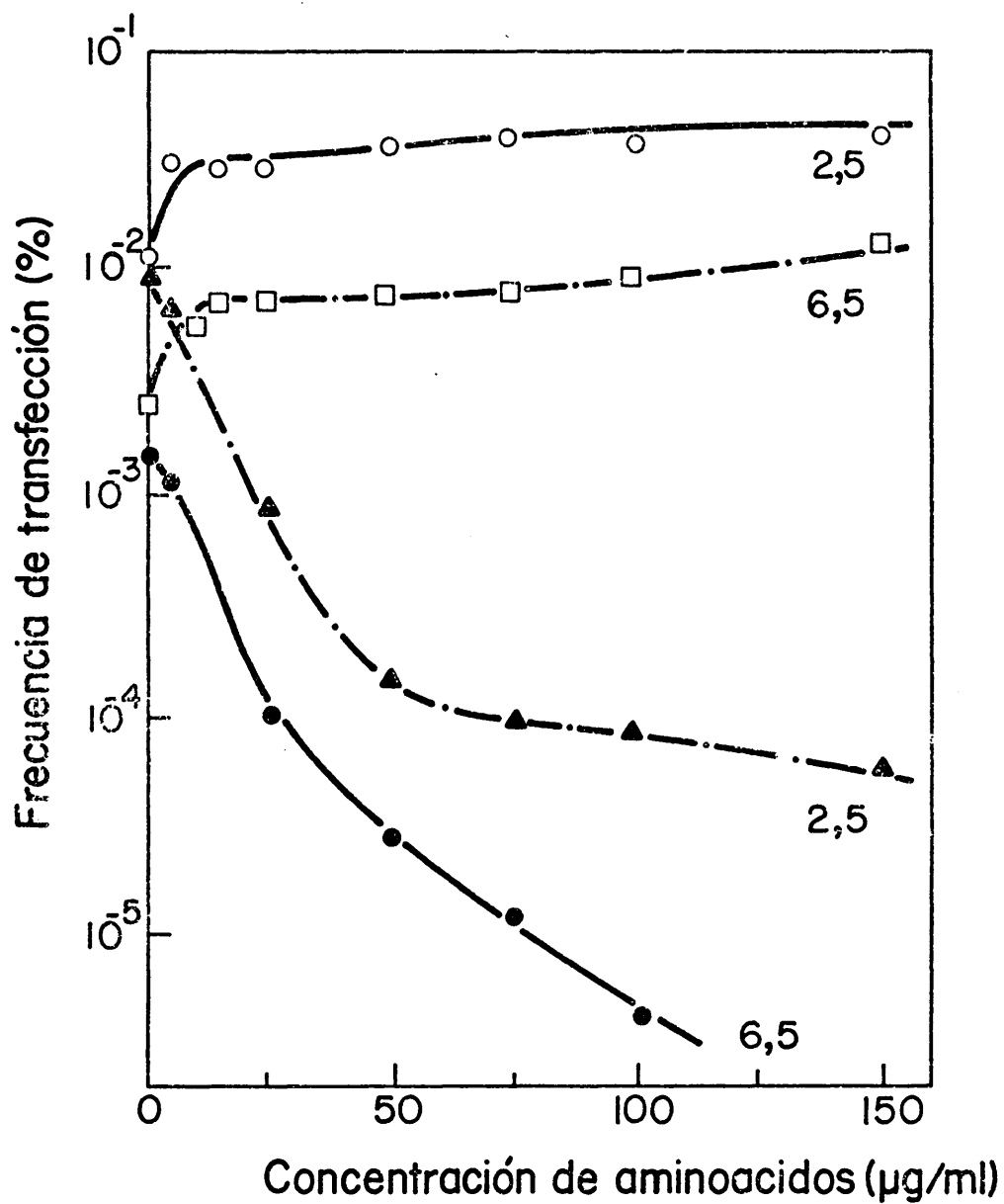


Fig. 1.- Efecto del ácido glutámico (○,●) y de la arginina (□,▲) sobre el desarrollo de la competencia en cultivo continuo a tiempos de duplicación de 2,5 y 6,5 horas. (Según LOPEZ y cols., 1975)

que actúan como estimulantes en los cultivos convencionales (BOTT y WILSON, 1968) actúan como inhibidores en cultivo continuo a tiempo de duplicación de 2,5 h, mientras que su efecto es estimulador cuando el tiempo de duplicación es 6,5 h. También los aminoácidos inhibidores de la competencia presentan un comportamiento similar, que resulta invertido con relación a cultivos ordinarios. Así pues, estos resultados parecen indicar que, en el sistema de B. subtilis, existen dos formas de alcanzar el estado de competencia. (PORTOLES y cols., 1977 a)

En cultivos ordinarios de B. subtilis se ha comprobado que algunos aminoácidos constituyentes de la pared bacteriana, pero no todos, (YOUNG y cols., 1963) inhiben el desarrollo de la competencia. Este hecho sugiere que la competencia está asociada con una inhibición de la formación normal de la pared. Concuerda con esta hipótesis el hecho de que la composición de la pared bacteriana está alterada en las células competentes, ya que se ha comprobado que el contenido en galactosamina de la pared de las células competentes, es notablemente mayor que el presente en las estirpes poco transformables (YOUNG, 1965).

En el sistema de H. influenzae, hay numerosas evidencias que demuestran que la competencia se desarrolla cuando se ralentiza el crecimiento reduciendo la aireación o colocando las células en un medio que no permita mucho crecimiento, si bien la síntesis de proteínas se mantiene (SPENCER y HERRIOT, 1965). Se ha sugerido que la eliminación de catabolitos que reprimen la síntesis de proteína(s) puede ser responsable del desarrollo de la competencia (MILLER y HUANG, 1972). Apoya esta hipótesis el hecho de que el adenosín-monofosfato cíclico, que elimina la represión de catabolitos (PASTAN y PERLMAN, 1970), induce una

competencia parcial en cultivos no competentes de H. influenzae (WISE y cols., 1973).

En el sistema de S. pneumoniae, la colina, que es un constituyente normal de la pared, estimula el desarrollo de la competencia, pero la sustitución de este compuesto por etanolamina (o N-metil etanolamina) la inhibe. El cambio de las células de un medio que contenga una de estas sustancias a un medio conteniendo la otra causa una alteración rápida en la competencia (TOMASZ y cols, 1971). Basado en estos resultados se ha postulado que el DNA se une a la región ecuatorial de la superficie celular que está siendo sintetizada, lo que hace necesario que en dicha región haya colina como componente de la pared (TOMASZ y cols., 1971).

Además de las sustancias descritas hasta este momento existen otras que estimulan o inhiben la competencia en los distintos sistemas. En el Cuadro II están recogidas las más importantes.

D.- FACTORES DE COMPETENCIA

Los primeros estudios sobre el control de desarrollo de la competencia fueron realizados en los sistemas de S. pneumoniae y S. sanguis. Los experimentos realizados por PAKULA y cols (1962) dieron las primeras evidencias de la existencia de un factor extracelular, producido por estirpes de S. sanguis del grupo H competentes, capaz de inducir la competencia en células no competentes de esta especie. Este factor ha sido purificado e identificado como un polipéptido básico sensible a la tripsina (LEONARD y COLE, 1972) de peso molecular 5000. En el sistema de

CUADRO II.- Algunas sustancias estimulantes o inhibidoras de la competencia (*)

Compuestos	Microorganismos		
	<u>B. subtilis</u>	<u>S. pneumoniae</u>	<u>H. influenzae</u>
Cloramfenicol	I	I	I
Dinitrofenol	-	-	I
Valina	E	E	-
Acido aspártico	E	-	E
Actinomicina D	-	I	-
Glicerol	I	-	I
Fluorato sódico	E	E	E
Sulfato amónico	E	-	-
Glucosa	-	E	-
Glucosa como fuente de carbono	-	E	-
Mg ²⁺	E	E	E
Ca ²⁺	-	E	E
Cu ²⁺	I	-	-
Fe ²⁺	I	-	-
Mn ²⁺	I	-	-

(*) Según NOTANI Y SETLOW (1974)

S. pneumoniae ha sido aislado un factor de competencia similar al de S. sanguis denominado "activador" cuyo peso molecular es 10.000 (TOMASZ y MOSSER, 1966). La capacidad de síntesis y respuesta al factor está genéticamente determinada, habiéndose aislado mutantes que no pueden sintetizar el factor de competencia (mutantes FC^-) o no pueden responder a él (mutantes receptor- FC^-). En el sistema de pneumococos se ha comprobado que el desarrollo de la competencia está relacionado cuantitativamente con la cantidad de factor de competencia detectable (TOMASZ y HOTCHKISS, 1964; TOMASZ, 1966). La adición de pequeñas cantidades de un factor de competencia a un cultivo no competente en una fase temprana del desarrollo es suficiente para inducir una onda de competencia, durante la cual se sintetiza nuevo factor autocatalíticamente. Dos cultivos de pneumococo creciendo a distinta densidad óptica empiezan a desarrollar la competencia a distintos tiempos. Sin embargo, cuando se mezclan dichos cultivos el desarrollo de la competencia del cultivo más diluido coincide con el del otro más denso (TOMASZ y HOTCHKISS, 1964). Por tanto, en este organismo, la competencia es rápidamente transferida de células competentes a células no competentes mediante el factor de competencia.

El factor de competencia de pneumococo se une a una proteína situada en la membrana de la célula denominada receptor del activador, siendo esta unión específica de especie. Dicho receptor posee un peso molecular de 50.000, siendo resistente al tratamiento con tripsina, lisozima, RNasa y fosfolipasa C, pudiendo ser liberado por sonicación o solubilizado por tratamiento con detergentes (LOPEZ, 1975).

El receptor del activador se une a éste y provoca así su inactivación.

HORNE y cols. (1977) han detectado dos tipos de interacciones entre las moléculas del activador y las células de pneumococos. En primer lugar, el activador cosedimenta con paredes celulares sufriendo una pérdida mínima de su actividad biológica. El activador puede unirse también a células enteras o a membranas plasmáticas sufriendo una inactivación. El primer tipo de unión es insensible al precalentamiento, de las paredes celulares, a 65-70° C durante 10 minutos y puede obtenerse usando paredes homólogas o heterólogas. Sin embargo, el segundo tipo de unión es inhibido por precalentamiento de las células o de las preparaciones de membranas plasmáticas. El activador unido puede ser recuperado de las células o de las membranas en una forma biológicamente activa mediante un precalentamiento.

Por otra parte, HORNE y cols. (1977) han aislado de la membrana plasmática de S. pneumoniae una proteína inhibidora del activador (AIP), que puede ser responsable del segundo tipo de unión del activador a las células. El AIP posee un peso molecular de 68.000, pudiendo inactivar al activador con una concentración muy baja (1,4 ng/ml). Esta proteína es sensible al calor y la inhibición del activador por el AIP es parcialmente reversible por calentamiento.

La unión del activador a la membrana plasmática de la célula parece ser un primer paso que inicia una cadena de hechos sucesivos. En primer lugar se sintetiza un determinante antigénico (TOMASZ y BEISER, 1965) y se adquiere una capacidad de autoaglutinación bajo ciertas condiciones fisiológicas (TOMASZ y

ZANATI, 1971). La síntesis del determinante antigénico puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas. Una vez sintetizado el determinante antigénico, las células pueden incorporar DNA exógeno por su zona ecuatorial (zona de crecimiento) de la pared celular, pero este proceso sólo puede ocurrir si la colina está presente en el ácido teicoico de la pared bacteriana. En la figura 2 aparecen las etapas previamente descritas y que sólo sufren las células que van a entrar en competencia.

Por otra parte, SETO y TOMASZ (1975 b) han comprobado que el activador de pneumococo induce la liberación o transporte de distintos componentes citoplásmicos, a través de la membrana, entre ellas moléculas de autolisina y de β -galactosidasa. Basándose en estos hechos y otras observaciones, TOMASZ ha propuesto un modelo de "desenmascaramiento" para explicar el fenómeno de inducción de la competencia en pneumococo. Según este modelo, el activador causa indirectamente, por inducción de la autolisina, pérdida de la pared celular en la zona de crecimiento, haciendo accesible al DNA extracelular un sistema preexistente en la membrana celular capaz de incorporar DNA.

En el sistema de B. subtilis, AKRIGG y AYAD (1970) afirmaron haber aislado un factor (de naturaleza proteica) capaz de inducir la competencia a cultivos celulares sometidos a choque osmótico. Según estos autores (AKRIGG y cols, 1969) dicho "factor inductor" produciría una liberación en el medio de la autolisina presente en la pared celular la cual degradaría específicamente los lugares de la superficie celular donde se encuentran situados los mesosomas, permitiendo que el DNA interaccione con estas estructuras membranosas. Estas experiencias

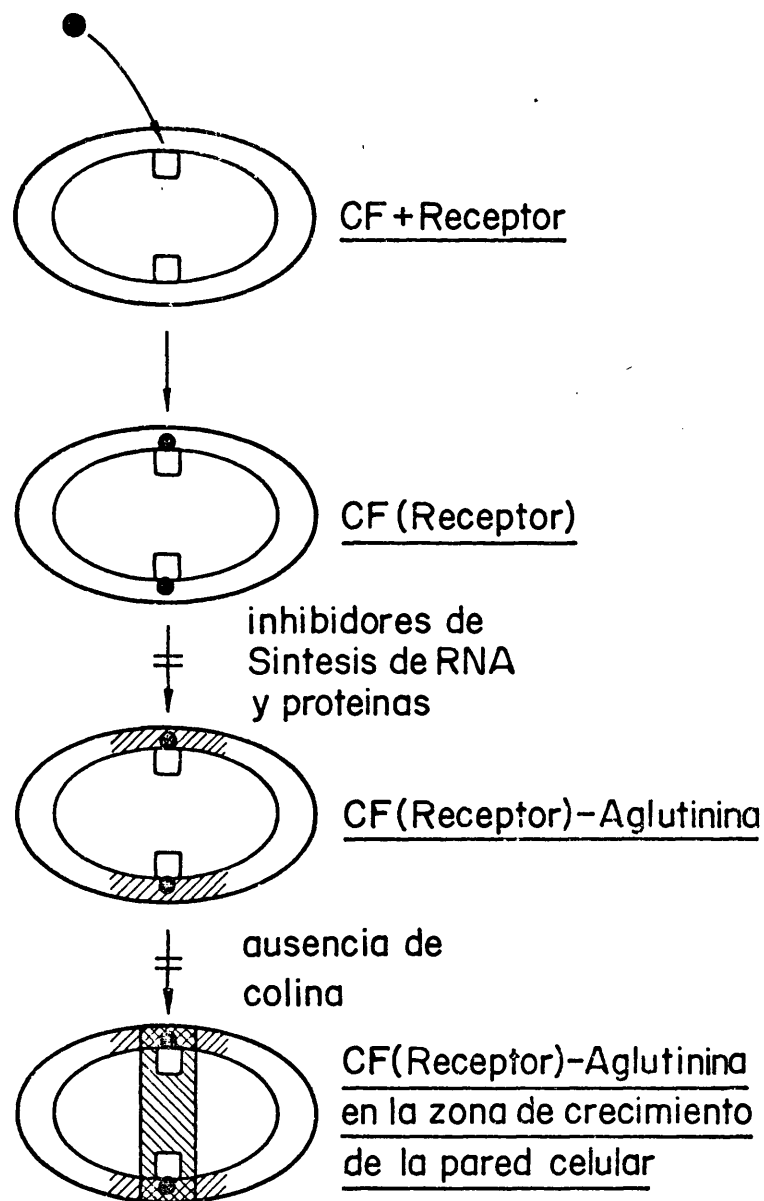


Fig. 2.- Modelo de las etapas tempranas en la adquisición del estado de competencia en *S. pneumoniae* (según LOPEZ, 1975). (●) = factor de competencia (CF) o activador; (□) = receptor del CF; la región rayada corresponde a la zona de crecimiento de la pared celular (región ecuatorial).

han sido muy discutidas debido a que son difícilmente reproducibles (STREIPS y YOUNG, 1971).

Posteriormente PIERSON y cols. (1972) detectaron un factor presente en los sobrenadantes de cultivos competentes, capaz de inducir la competencia a células que la habían perdido como consecuencia de un choque osmótico. Dicho factor es sensible a enzimas proteolíticos y a temperaturas elevadas. Por otra parte JOENJE y cols. (1972) realizaron experiencias de estimulación de células fisiológicamente poco competentes, sustituyendo el medio en que se encontraban dichas células por sobrenadantes procedentes de cultivos competentes. De esta manera, los autores comprobaron que dichas células alcanzaban el máximo de competencia antes que los controles resuspendidos en medio fresco. Esta actividad estimulante de la competencia (CSA) no ha podido ser aislada hasta el momento, pero se sabe que posee un peso molecular pequeño, no es retenida por filtros de nitrocelulosa, es relativamente resistente al calor, a repetidas congelaciones y descongelaciones y curiosamente resistente a tratamiento con tripsina y pronasa, lo que sugiere que dicha actividad es distinta a la previamente descrita por otros autores.

Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio (ESPINOSA y cols, 1976) parecen indicar que el fenómeno de estimulación de la competencia es más complejo que el descrito por JOENJE y cols (1972). Al realizar experiencias de estimulación de células fisiológicamente poco competentes, se observan dos máximos de competencia, así como dos máximos en los niveles de CSA presentes en los sobrenadantes de dichas células después de 210 minutos de cultivo. Estas fluctuaciones de CSA durante la

estimulación del desarrollo de la competencia indican que el CSA existente es inactivado o usado por las células para alcanzar la competencia. Posteriormente, dicho CSA sería reactivado o resintetizado, pareciendo más probable una síntesis, ya que las células en un proceso normal de desarrollo de la competencia son capaces de producir CSA. Parece además que las fluctuaciones en los niveles de CSA están relacionadas con las variaciones en los niveles de competencia.

Ha sido aislado un mutante divisional (Div. VI)^(*) de B. subtilis no competente, incapaz de sintetizar CSA, y de ser estimulado por esta sustancia, aunque es capaz de fijarla (GARCIA, 1974).

Debido a la complejidad del proceso de estimulación de la competencia se ha desarrollado un modelo matemático que permite conocer la cantidad de células estimuladas a la competencia, la pérdida de competencia celular y la cantidad de CSA producido y fijado por las células (ESPINOSA y cols, 1977). Este modelo no incluye sin embargo el fenómeno del desarrollo normal del estado de competencia en B. subtilis.

E.- LA COMPETENCIA Y EL PROCESO DE ESPORULACION

En el sistema de B. subtilis se ha intentado relacionar la competencia con las primeras etapas de la formación de esporas (YOUNG y SPIZIZEN, 1961). Apoya esta hipótesis el hecho de que algunos mutantes deficientes en la esporulación son poco transformables. Por otra parte, ambas deficiencias están correlacionadas con una resistencia a la actinomicina D (EPHRATI-ELIZUR, 1965).

(*) Mutantes Div.: mutantes incapaces de dividirse. Los mutantes Div. VI se caracterizan por presentar una separación anormal de las células hijas, formando largos filamentos con septos diferenciados, pero no células aisladas. (YOUNG y WILSON, 1972).

Sin embargo se conocen mutantes asporógenos que son transformables (SCHAEFFER y cols. 1965). Contra esta aparente contradicción, SCHAEFFER y cols (1965) han postulado que, como en el proceso de esporulación existen varias etapas sucesivas, dichos mutantes podrían tener bloqueadas las últimas fases de este proceso las cuales no estarían relacionadas con la competencia y por tanto no afectarían al desarrollo de ésta.

Por otra parte, SPIZIZEN y cols. (1966) observaron que el ácido α -picolínico, que es un inhibidor de la esporulación, inhibía el desarrollo de la competencia. Dicho agente actúa inhibiendo el ciclo de Krebs, siendo este ciclo necesario para que se produzca la síntesis de esporas.

Este hecho llevó a BOTT y WILSON (1967) a sugerir que la inducción de la actividad del ciclo de Krebs se produciría antes de que comenzara el desarrollo de la competencia. No obstante, estos mismos autores (BOTT y WILSON, 1968) comprobaron que, en sus condiciones experimentales, el ácido α -picolínico y el malonato sódico (inhibidores del ciclo de Krebs) no tenían efecto sobre la competencia y por tanto postulaban que la competencia se produciría por un bloqueo de una ruta metabólica que normalmente conduciría a la formación de endosporas.

Todos estos hechos previos planteaban una controversia acerca de si la competencia estaría relacionada o no con una etapa temprana de esporulación, en la cual ya habría comenzado el ciclo de Krebs.

En nuestro laboratorio se han realizado experiencias con el fin de dilucidar si el ciclo de Krebs y, consecuentemente la esporulación, están relacionados con el desarrollo de la competencia. Como se ha dicho previamente, la arginina es un inhibidor del desarrollo de la competencia en cultivos realizados en quimostato a un tiempo de duplicación de 2,5 h (LOPEZ y cols., 1975). Posteriormente, PORTOLES y cols. (1977a) quisieron comprobar si dicho efecto era debido a una inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ya que se ha demostrado que la arginina es un inhibidor de la síntesis de un enzima del ciclo de Krebs, la aconitasa, en cultivos de B. subtilis desarrollándose en un cultivo continuo, en un medio mínimo con glucosa (HANSON y COX, 1967).

Dicho efecto inhibitorio de la competencia era revertido específicamente cuando se adicionaba manganeso (y no otros cationes divalentes) a cultivos continuos tratados con arginina (LOPEZ y cols., 1978) debido, probablemente, a que la arginasa, necesaria para transformar la arginina en ornitina (en el ciclo de la urea), requiere manganeso para su acción. Así, al adicionar este catión divalente al cultivo, la arginina comenzaría a ser procesada y la represión del ciclo de Krebs desaparecería, restableciéndose consecuentemente la transformabilidad de los cultivos. Estos resultados indicarían que para la adquisición del estado de competencia en B. subtilis se requiere un ciclo de Krebs intacto.

Por otra parte, HANSON y COX (1967) señalan que el ciclo de Krebs en el sistema de B. subtilis presenta dos fases: una primera que llega hasta el α -cetoglutarato, que es emplea-

da por las bacterias para la biosíntesis del ácido glutámico y una segunda fase implicada en la oxidación del α -cetoglutarato.

Otro hecho de interés es el observado por RAMOS y cols (1962) quienes señalan que, en B. subtilis, el ciclo de Krebs parece ser la única vía implicada en la síntesis de glutamato, puesto que mutantes deficientes en la síntesis de aconitasa requieren absolutamente glutamato. Además, SPIZIZEN y cols. (1966) han señalado que varios de estos mutantes que requieren glutamato no son competentes. Estos resultados están de acuerdo con SZULMAJSTER y HANSON (1965) quienes señalan que los mutantes aconitasa⁻, que sólo pueden crecer en presencia de glutamato, no son transformables.

Con el fin de dilucidar a qué nivel está implicado el ciclo de Krebs en el desarrollo de la competencia, se realizaron trabajos en nuestro laboratorio empleando dos inhibidores específicos de enzimas del ciclo de Krebs, el α -cetoglutarato (inhibidor de la aconitasa) y el malonato (inhibidor de la succínico deshidrogenasa) (LOPEZ, 1975). La adición de α -cetoglutarato a cultivos puestos en competencia en un quimostato a tiempos de duplicación de 2,5 h, no producía una inhibición de los niveles de competencia, sino que, por el contrario, se observaba una ligera estimulación. Estos resultados podrían indicar que la vía del ciclo de Krebs implicada en la competencia era la segunda (paso de succinil CoA a oxalacetato). No obstante, cuando a dichos cultivos se adicionaba malonato (siempre en presencia de α -cetoglutarato en cantidades suficientes para inhibir la succínico deshidrogenasa), no se obser-

vaba ningún efecto estimulante o inhibidor en los niveles de competencia alcanzados en el cultivo (Fig.3-A) (PORTOLES y cols., 1977 a).

Por lo tanto, estos hechos han permitido concluir que el ciclo de Krebs no está relacionado con el desarrollo de la competencia (o por lo menos no directamente), ya que las células bacterianas emplearían dicho ciclo solamente como una vía para sintetizar ácido glutámico y el efecto inhibitorio del malonato sobre la succínico deshidrogenasa no afectaría a dicha síntesis.(Fig. 3 B).

Así, el desarrollo de la competencia no parece estar relacionado con la esporulación en sus primeras etapas cuando comienza el ciclo de Krebs.

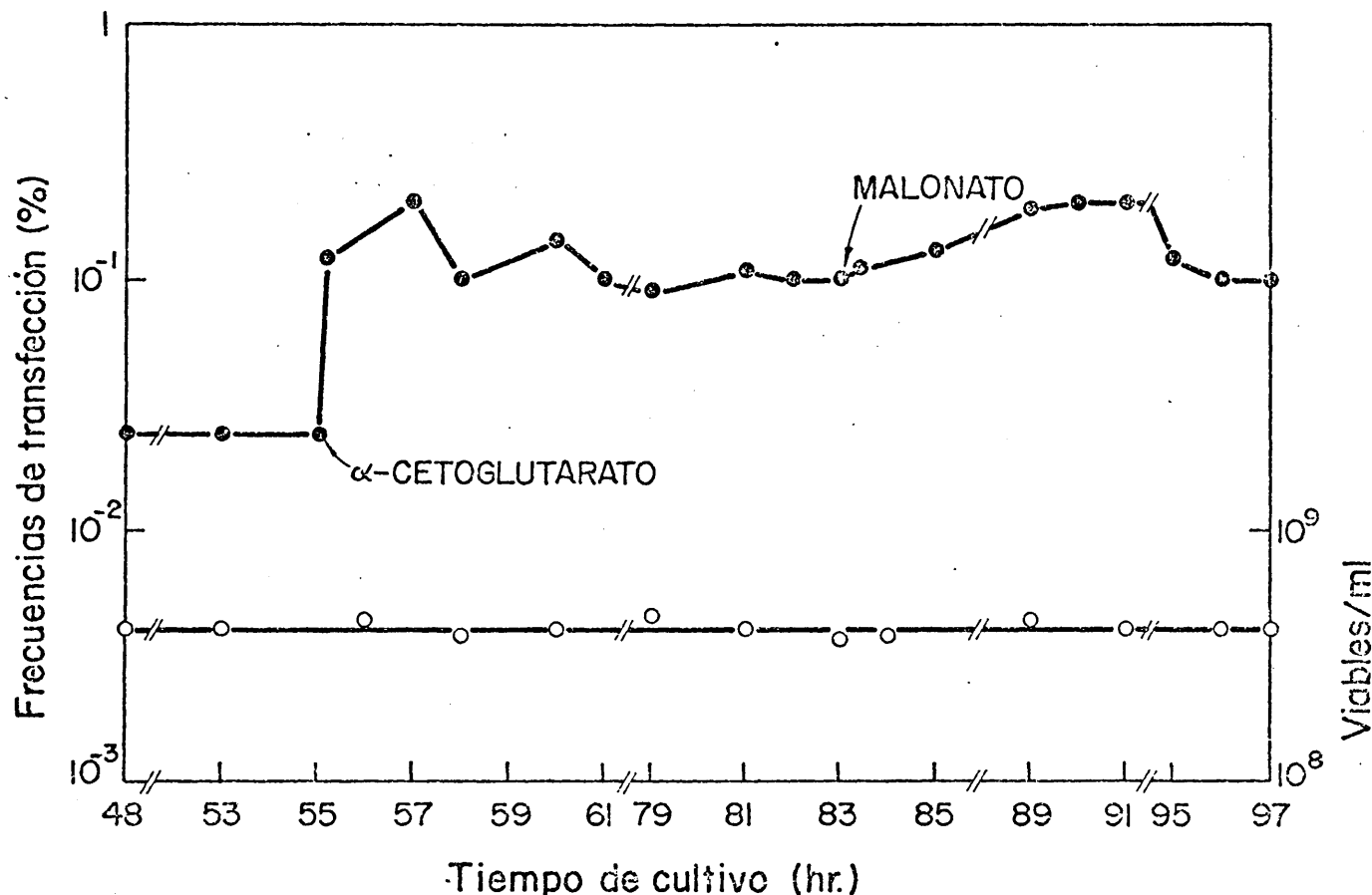


Fig. 3A.- Efecto del α -cetoglutarato y del malonato en el desarrollo de la competencia de *B. subtilis* multiplicándose en un quimostato a un tiempo de duplicación de 2,5 h. Después de la consecución de un nivel constante de competencia, el α -cetoglutarato (0,57 mM) se añadió continuamente al quimostato. 28 horas más tarde, se añadió malonato (10 mM) de modo continuo en presencia de α -cetoglutarato. A diferentes tiempos, se tomaron muestras y se determinaron sus niveles de viabilidad (o) y de competencia por transfección (●) (según PORTOLES y cols., 1977 a).

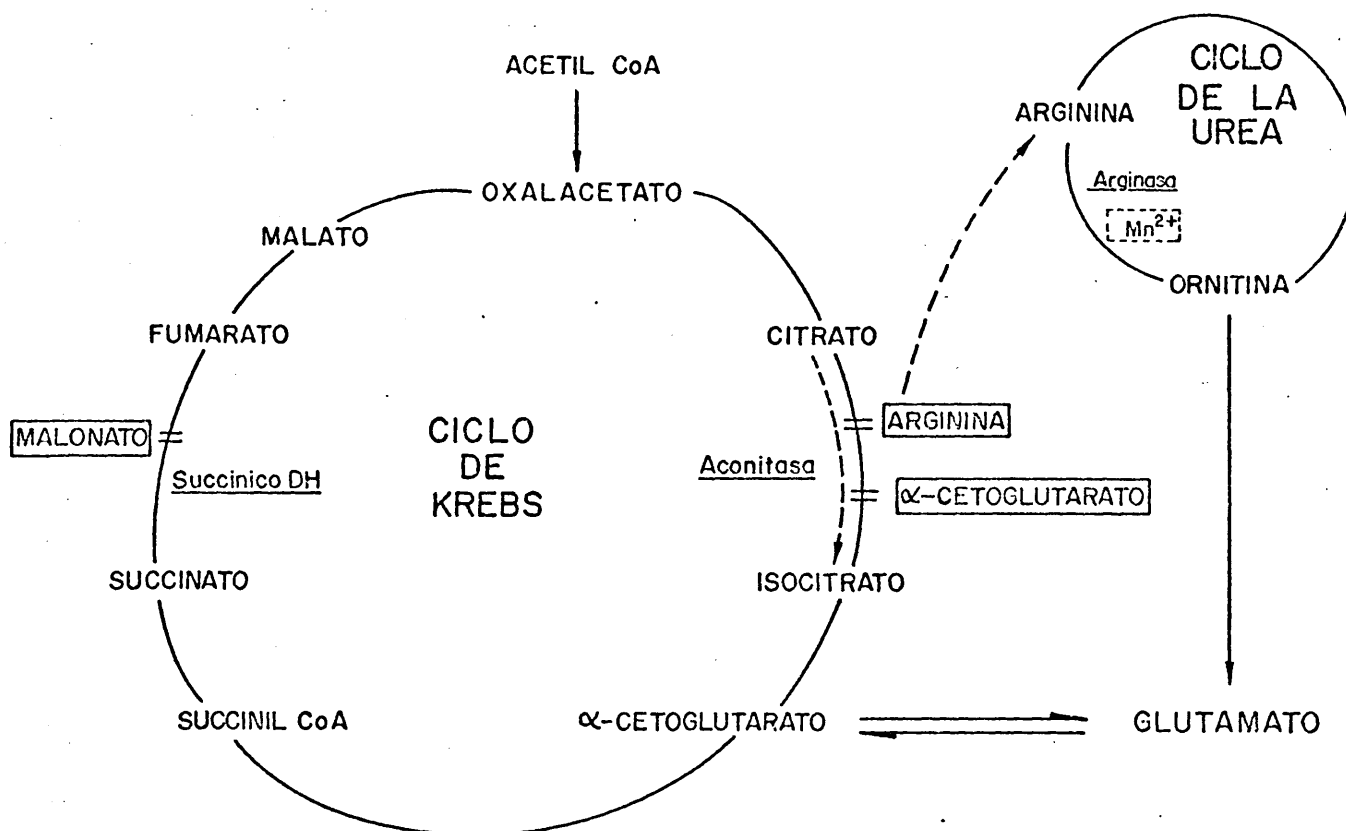


Fig. 3B.- Esquema del ciclo de Krebs y de la urea, posiblemente implicados en la competencia (véase texto). Según LOPEZ, 1975.

III. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS CELULAS COMPETENTES

Una vez establecidos los factores implicados en el desarrollo de la competencia y la fisiología de dicho estado, es necesario conocer las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y metabólicas que diferencian a las células competentes de las no competentes en una población bacteriana. Sin embargo, conviene tener muy presente que en cualquier sistema de transformación la característica primordial de las células competentes es la capacidad de incorporar DNA exógeno del medio.

A.- PROPIEDADES MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS COMPETENTES

1. Tamaño celular

En el sistema de transformación de B. subtilis se han podido establecer diferencias morfológicas entre los dos tipos de células de la población bacteriana (competentes y no competentes) empleando técnicas de autorradiografía. Estas técnicas

consisten, esencialmente, en la exposición de cultivos competentes a DNA transformante marcado con tritio durante un tiempo suficientemente largo como para permitir a todas las células competentes la incorporación del DNA del medio. Después, las muestras se exponen a una emulsión fotográfica durante un período prolongado, considerándose que este tiempo es suficiente cuando el número medio de granos de plata por célula es, al menos, de 3 (VERMEULEN y VENEMA, 1974 a).

Así, empleando esta técnica diferencial se ha podido comprobar que las células competentes de B. subtilis son ligeramente más pequeñas que las no competentes (JAVOR y TOMASZ, 1968; VERMEULEN y VENEMA, 1974 a).

2. Contenido en cuerpos nucleares

Respecto al número de núcleos presentes en las células competentes, la mayoría de los estudios han indicado que estas células son uninucleadas (BRESLER y cols., 1968; SINGH y PITALE, 1968). Sin embargo, análisis al microscopio óptico de poblaciones competentes obtenidas por centrifugación en gradientes lineales de sacarosa de cultivos de B. subtilis (SINGH y PITALE, 1968) no descartan la posibilidad de que células binucleadas puedan alcanzar el estado de competencia. Por otra parte, ERICKSON y COPELAND (1972), después de someter a un cultivo competente de B. subtilis a centrifugación en gradientes de densidad, observaron que la fracción enriquecida en células competentes parecía poseer principalmente células binucleadas.

EPSTEIN (1971), en un estudio realizado sobre el desarrollo de la competencia empleando rayos X, sugirió que la

población precompetente constaría de una mezcla de células uninucleadas y binucleadas. Estas últimas llegarían a ser mononucleadas en un medio que permitiera el desarrollo de la competencia. No obstante, los resultados obtenidos por VERMEULEN y VENEMA (1974 a) demuestran que el desarrollo de la competencia no requiere dicha conversión. Estos autores, empleando técnicas de autorradiografía, comprobaron que solamente el 50% de las células competentes son binucleadas. Ya que el 45% de dichas células competentes tienen un septo completo, en realidad tales células pueden ser consideradas como células mononucleadas que no se han separado todavía. Comparando esta distribución de núcleos en las células competentes, con la obtenida en células no competentes, los mismos autores comprobaron que tal distribución era estadísticamente similar. Por tanto, parece comprobado que la distribución de cuerpos nucleares en células competentes y no competentes es semejante, siendo predominantemente uninucleadas ambos tipos de células. Estos resultados no apoyan la posibilidad de que el desarrollo de la competencia requiera la conversión de células binucleadas a mononucleadas, como postuló EPSTEIN (1971).

3. Estructuras mesosómicas

Por otra parte, VERMEULEN y VENEMA (1974 b) han realizado estudios para determinar si, en el sistema de B. subtilis, la fracción mesosómica es similar en células competentes y no competentes.

Los mesosomas, en cultivos de B. subtilis fijados con tetraóxido de osmio, aparecen como estructuras intracitoplásmicas formadas por capas membranosas o por vesículas membranosas.

Análisis realizados por microscopía electrónica de secciones seriadas revelan que los mesosomas están conectados con la membrana plasmática, pudiendo distinguirse dos tipos diferentes: a) mesosomas que aparecen dentro de los cuerpos nucleares (mesosomas nucleares) y b) mesosomas situados fuera de los núcleos (mesosomas de la membrana plasmática).

Los mesosomas nucleares aparecen generalmente en la región ecuatorial de la célula y rara vez en sus extremos, mientras que el segundo tipo predomina en los polos de las células. La distribución de ambos tipos de mesosomas, excepto los mesosomas nucleares en células con un septo de división, es similar en células competentes y no competentes.

Durante el desarrollo de la competencia el número de mesosomas nucleares se incrementa, coincidiendo el máximo de competencia con el máximo número de mesosomas. Realizando un análisis al microscopio electrónico de secciones seriadas, VERMEULEN y VENEMA (1974 b) han comprobado que dicho incremento es debido a un aumento en el número de células que poseen tales mesosomas, así como a un aumento en la proporción de mesosomas por célula. Por el contrario, el número de mesosomas unidos a la membrana plasmática disminuye durante el desarrollo de la competencia, no conociéndose hasta este momento si esta disminución es debida a una conversión de este tipo de mesosomas al tipo nuclear.

B.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

1. Densidad de las células

Las células competentes poseen menor densidad de flo-

tación que las células no competentes. Este hecho ha permitido separar estos dos tipos de poblaciones celulares empleando técnicas de centrifugación en gradientes de densidad.

Los primeros intentos realizados para separar la fracción competente de la no competente en un cultivo de B. subtilis se deben a SINGH y PITALE, (1967). Estos autores sospechaban que las células competentes eran más ligeras que las no competentes, por lo que sometieron un cultivo competente de B. subtilis a centrifugación zonal en gradiente continuo de sacarosa observando dos bandas, de las cuales la superior era la que presentaba mayor cantidad de células capaces de incorporar DNA exógeno.

Al año siguiente, CAHN y FOX (1968) postularon que la separación obtenida por SINGH y PITALE podía ser debida a una diferencia en la densidad de flotación de las células competentes respecto al resto de las células de la población. Debido a este hecho pensaron realizar una separación isopícnica de la población. Para este tipo de separaciones suele emplearse gradientes de cloruro de cesio, pero este compuesto presenta el inconveniente de afectar la viabilidad celular. En busca de un producto inocuo, los autores pensaron emplear gradientes de renografina que ya habían sido utilizados por TAMIR y GILVARG (1966), con buenos resultados, para separar células de B. megaterium en distintas fase de esporulación, de las células vegetativas.

CAHN y FOX (1968), sometiendo una población competente a centrifugación en gradiente lineal de renografina, obtuvieron un sedimento y una banda en la parte superior sin pérdida alguna

en la viabilidad celular. Dicha banda contenía una fracción celular que presentaba una frecuencia de transformación diez veces superior a la obtenida en la población original sin fraccionar, mientras que las células del sedimento poseían una frecuencia de transformación mil veces inferior a la original. De esta manera, demostraron que las células competentes eran menos densas que las no competentes.

Por otra parte HADDEN y NESTER (1968) lograron también una separación de la población empleando gradientes de renografina de tres pasos conteniendo 50%, 30% y 12,5% del producto. De este modo las células competentes aparecían en una banda en la parte superior del gradiente (entre las capas de 12,5% y 30% de renografina) y las no competentes en una banda situada en la interfase entre las otras dos capas de renografina (de 30% y 50%). Asimismo, los autores comprobaron que las células competentes, cuando perdían el estado de competencia, después de varias horas, adquirirían una densidad semejante a la de las células no competentes.

Posteriormente, esta técnica se ha ido simplificando empleando centrifugación en gradientes de renografina con dos capas y finalmente con una sola concentración de renografina (ARCHER, comunicación personal).

La técnica de separación empleada por CAHN y FOX (1968) y por HADDEN y NESTER (1968) puede ser aplicada únicamente para pequeñas concentraciones de células. Por ello, JOENJE y cols. (1975) han empleado un método consistente en mezclar una población concentrada de células con la renografina, lo que permite fraccionar grandes cantidades de cultivos celulares (más de 10 litros).

2. Composición de la pared celular

Es obvio que la compleja estructura de la pared bacteriana es un obstáculo para la penetración del DNA transformante, lo que podría explicar la dificultad para obtener el desarrollo de la competencia en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, ya que la complejidad de su pared es mayor que la presentada por los organismos Gram-positivos.

Las células de B. subtilis, puestas en competencia mediante cultivos convencionales, presentan un aumento en la concentración de N-acetilgalactosamina y alanina en su pared, mientras que las células no competentes poseen mayor cantidad de glucosamina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico (YOUNG y cols. 1963 y 1964). Estudios realizados por nosotros sobre la composición de la pared bacteriana en el sistema de transformación de B. subtilis en quimostato a tiempo de duplicación de 2,5 h (LOPEZ y cols, 1978), han permitido comprobar que las paredes de las células competentes de dichos cultivos continuos contienen menor concentración de ácido diaminopimélico y glucosamina cuando se compara con la concentración de dichos aminoácidos en las paredes de células competentes obtenidas en cultivos ordinarios (Cuadro III). Este hecho parece indicar una distinta composición del mucopéptido de la pared de células competentes dependiente del tipo de cultivo empleado .

La importancia de la composición de la pared en la competencia se pone de manifiesto también en el sistema de pneumococos. En estos microorganismos, es necesario que la colina esté presente en las paredes celulares para que se pro-

CUADRO III.- Composición química de las paredes celulares (según LOPEZ y cols., 1978)

- A) componentes minoritarios de muestras procedentes de cultivos continuos a tiempo de duplicación de 2,5 h .
 B) componentes mayoritarios de muestras procedentes de cultivos ordinarios y de cultivo continuo a tiempo de duplicación de 2,5 h.

A

Componentes	μ moles/ml
Lisina	0,14492
Histidina	0,06707
Arginina	0,09638
Ac. aspártico	0,19291
Treonina	0,01129
Serina	0,01132
Prolina	0,08984
Glicocola	0,20202
Valina	0,15362
Isoleucina	0,12367
Leucina	0,17298
Alanaina	1,38235

B

Componentes	Cultivo ordinario μ moles/ml	Cultivo continuo μ moles/ml
Ac. glutámico	1,0140	1,0784
Ac. diaminopimélico	1,05561	0,4728
Ac. murámico	0,12362	0,0834
Glucosamina	0,69931	0,1345
Galactosamina	0,10018	0,1063

duzca la incorporación del DNA exógeno, hasta tal punto que la sustitución de colina por etanolamina dificulta el desarrollo de la competencia (TOMASZ Y cols., 1971).

Con el fin de comprobar si es necesaria la integridad estructural de la pared bacteriana para la transformabilidad de organismos Gram-positivos, se han llevado a cabo una serie de estudios encaminados a dilucidar este problema, mediante la eliminación, parcial o total, de la pared celular.

Las primeras experiencias realizadas en el sistema de B. subtilis sobre este tema se deben a MILLER y LANDMAN (1963). Estos autores observaron que el tratamiento con lisozima de los complejos formados por las células competentes y el DNA, reduce notablemente las frecuencias de transformación. Esta disminución parecía ser debida a un decrecimiento de la capacidad celular para unir el DNA transformante según comprobaron posteriormente los mismos autores (MILLER y LANDMAN, 1965). Además, estos autores observaron que los protoplastos, obtenidos por tratamiento con lisozima, no eran transformables. Experimentos de otros autores han contradicho estos resultados (YOUNG, 1967; BODMER y LAIRD, 1968), demostrando que células tratadas con lisozima eran capaces de retener el DNA asociado a ellas. El tratamiento con lisozima favorecería la transformabilidad (PROZOROV, 1965) y según HIROKAWA e IKEDA (1966) los protoplastos serían transformables. TICHY y LANDMAN (1969) han sugerido una razón para explicar esta aparente contradicción. Dichos autores han observado que una población tratada con lisozima es heterogénea y contiene bacilos resistentes a lisozima, formas bacilares osmóticamente sensibles, "cuasiesferoplastos" (protoplastos con restos de pared) y protoplastos. Sus resultados muestran que todas las

estructuras osmóticamente sensibles pueden unir DNA y que el tratamiento con lisozima estimula la reacción de unión, pero que el transporte a través de la membrana requeriría la presencia, al menos parcial, de la pared celular. De este modo, cuasiesferoplastos expuestos a DNA transformante y sometidos a condiciones que permiten la síntesis de novo de la pared celular muestran mayor grado de transformabilidad que las células normales. Por lo tanto, estos hechos indican que, para que el DNA transformante se incorpore, es necesario, al menos, la existencia de restos de pared bacteriana.

MILLER y cols. (1972) intentaron reproducir las experiencias de HIROKAWA e IKEDA (1966) empleando sus mismas condiciones experimentales, con el fin de comprobar si los protoplastos poseían la capacidad de incorporar DNA exógeno y posteriormente integrarlo en su cromosoma. Dichos autores comprobaron que la superficie de los protoplastos, procedentes de células competentes, no era capaz de unir DNA exógeno de una forma irreversible, pero no descartan la posibilidad de que proteínas, presentes en la membrana celular, con afinidad por el DNA, sean puestas de manifiesto al eliminar la pared bacteriana, permitiendo una unión del DNA a los protoplastos en una forma sensible a la desoxirribonucleasa. Sin embargo, como el DNA no penetra en los protoplastos, los resultados de HIROKAWA e IKEDA (1966) no pueden ser explicados sólo por la presencia de cuasiesferoplastos, sino por un sistema de lisis parcial en el que se podría producir incorporación y recombinación del DNA.

3. Carga eléctrica de la pared celular

JENSEN y HAAS (1963 b) han estudiado la carga de la superficie de B. subtilis en relación con la aparición de la

competencia. Estos autores usaron como medida del potencial electrocinético de la superficie bacteriana, la capacidad celular para penetrar a través de filtros de acetato de celulosa con poros de distinto diámetro, ya que este método permite fraccionar partículas en función de la carga más que del tamaño (JENSEN y HAAS, 1963 a). Realizando este fraccionamiento en cultivos de B. subtilis, los autores comprobaron que la competencia está directamente relacionada con la carga de la superficie de la célula receptora. Además, la aparición del estado de competencia se caracteriza por un gran incremento de la electronegatividad de la pared y, posteriormente, la liberación de factores inductores de la competencia, provocaría una lenta disminución de la carga negativa neta de la superficie celular hasta que el DNA, cargado negativamente, pueda ser atraído, produciéndose una interacción entre el DNA y la célula receptora de carácter iónico.

C.- PROPIEDADES METABOLICAS

Las células competentes, además de presentar modificaciones de carácter morfológico y fisicoquímico, presentan alteraciones de tipo metabólico.

1. Situación del DNA en las células competentes

Es necesario hacer resaltar el hecho de que las células competentes de B. subtilis presentan la síntesis de DNA reducida (BODMER, 1965).

Según MCCARTHY y NESTER (1967), durante el desarrollo de la competencia sólo el 50% de las células competentes parti-

ciparía en la síntesis de DNA. Posteriormente, ARCHER y LANDMAN (1969) comprobaron que, en el sistema de B. subtilis la síntesis de DNA no es necesaria para el desarrollo de la competencia. Dichos autores emplearon en sus experiencias cultivos de B. subtilis auxótrofos para timina y triptófano. Después de incubar durante varias horas las células, en ausencia de dicho aminoácido, lograban sincronizar el cultivo con sus cromosomas a término. Después, añadían triptófano al medio, pero no timina, estando por tanto parada la síntesis de DNA. Pudieron observar que en estas condiciones los cultivos eran capaces de desarrollar la competencia y por tanto no era necesaria la síntesis de DNA para este proceso, lo que concuerda con observaciones previas de FARMER y ROTHMAN (1965), quienes comprobaron que las células competentes de una población de B. subtilis son más resistentes a la muerte por carencia de timina, que las no competentes.

DOOLEY y cols. (1971), empleando cultivos competentes de B. subtilis fraccionados en gradientes de renografina, comprobaron que las células precompetentes presentan una síntesis de DNA ralentizada, comparada con la observada en células no competentes, cuando se realizaban estudios sobre la posición de los tenedores de replicación. Además, en las mismas condiciones experimentales, la replicación del DNA de las células competentes parecía como si se hubiera parado cerca del origen de replicación.

ARCHER y LANDMAN (1969) , sincronizando cultivos de B. subtilis, observaron que las células bacterianas manteniendo sus cromosomas a término, eran capaces de desarrollar la competencia, sin posterior replicación del DNA.

WILSON y BOTT (1971) estudiaron el efecto del ácido nalidíxico, inhibidor de la síntesis de DNA, sobre la transformación. Dichos autores observaron que este antibiótico producía una inhibición de la transformación bacteriana, cuando se trataban las células con dicha droga, antes de adicionar el DNA transformante. El grado de inhibición dependía del tiempo de contacto y de la concentración del antibiótico.

Sin embargo, al año siguiente PEDRINI y cols. (1972) comprobaron que el ácido nalidíxico, a concentraciones que bloquean completamente la replicación del DNA de B. subtilis, no inhibe su transformación genética. Esta hipótesis fue confirmada por GARCIA (1974), comprobando que, en el sistema de estimulación de la competencia, el ácido nalidíxico no ejercía efecto alguno sobre los niveles de competencia e incluso, en algunas ocasiones, obtenía ligeros efectos estimulantes (Fig. 4).

Por otra parte, las células bacterianas, cuando son expuestas a irradiación con rayos ultravioleta (la cual provoca formación de dímeros de pirimidina, principalmente de timina) presentan una disminución de la capacidad de fotorreactivación del DNA alterado (KELNER, 1964), debido, probablemente, a la carencia del enzima reparador responsable de dicho proceso.

HARRIS y BARR (1969, 1971 a), realizando análisis de DNA extraído de células competentes, comprobaron que aproximadamente el 5% de dicho DNA se encuentra en forma monocatenaria

Finalmente ha sido comprobado que en el sistema de S. pneumoniae las células competentes tienen la síntesis de DNA reducida (EPHRUSSI-TAYLOR y FREED, 1964).

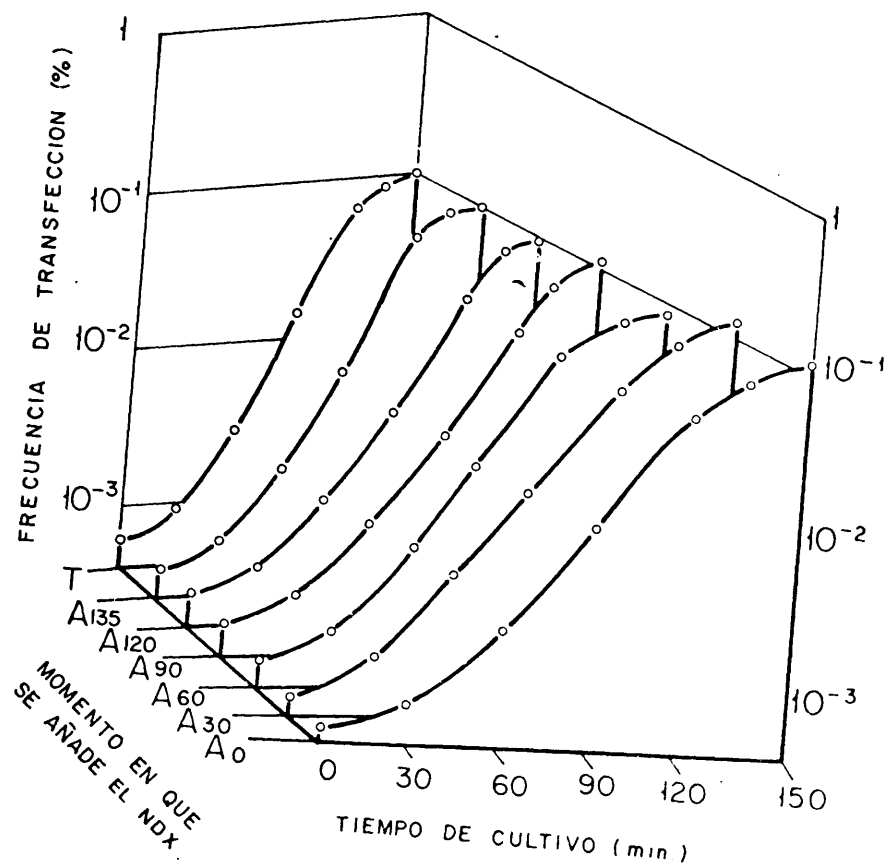


Fig. 4.- Proceso de estimulación de la competencia en presencia de ácido nalidíxico (según GARCIA, 1974).

2. Síntesis de RNA y proteínas en las células competentes.

Además de todas las observaciones ya hechas acerca de la situación del DNA, DOOLEY y cols. (1971) comprobaron que las células competentes muestran un decrecimiento en la relación síntesis de RNA/síntesis de proteínas. KAMMEN y cols. (1966), en el sistema transformante de B. subtilis, utilizando actinomicina D (un inhibidor de la síntesis de m-RNA), comprobaron que disminuían los niveles de transformabilidad. Por otra parte, empleando rifamicina, que es un inhibidor de la síntesis de la RNA-polimerasa, PORTOLES y cols. (1975) comprobaron que, en el sistema de estimulación de la competencia por líquidos metabólicos, es necesaria una síntesis de proteínas dirigida por el RNA mensajero para el desarrollo de la competencia.

KAMMEN y cols. (1966) observaron que, concentraciones subinhibitorias de puromicina, inhibían no sólo el desarrollo de la competencia, sino que incluso destruían la competencia de cultivos que ya la habían alcanzado, sin alterar la interacción entre el DNA transformante y las células competentes. Estos autores postulan que para el desarrollo y mantenimiento de la competencia es necesaria una proteína de vida media muy corta, ya que la competencia es muy sensible a la puromicina.

Por otra parte TICHY (1972) postuló la existencia de síntesis de novo de proteínas durante el desarrollo de la competencia. Dicho autor, al adicionar cloramfenicol (inhibidor de la síntesis proteica) al medio de cultivo durante el desarrollo de la competencia, observó que los niveles de transformación se reducían prácticamente a cero . No obstante, cuando

dicho antibiótico era añadido al medio poco antes del máximo de competencia, no se observaba inhibición. Estos hechos parecían indicar que las células necesitan una síntesis de proteínas no continua para desarrollar la competencia.

Sin embargo, PORTOLES y cols. (1975) comprobaron, adicionando lincomicina cinco minutos antes del máximo de competencia, que es necesaria una biosíntesis continuada de proteínas durante el proceso de estimulación de la competencia (Fig. 5). Estos resultados concuerdan con los observados por TOMASZ (1970) en el sistema de transformación de S. pneumoniae. Este autor ha comprobado que las células fisiológicamente incompetentes, a las que se añade activador para inducir la competencia, sintetizan proteínas de novo (además de dicho activador) de una forma continuada durante todo el proceso de inducción de la competencia. Si dicha síntesis cesa, se pierde incluso el nivel de transformabilidad previamente alcanzado.

En el sistema de H. influenzae, RANHAND y LICHSTEIN (1969) han comprobado que el cloramfenicol, la eritromicina y la estreptomicina (inhibidores de la síntesis proteica) inhiben la transformación.

Finalmente, estudios realizados en otros sistemas bacterianos han demostrado la necesidad de una síntesis proteica para el desarrollo de la competencia en todos los sistemas transformantes (NOTANI y SETLOW, 1974).

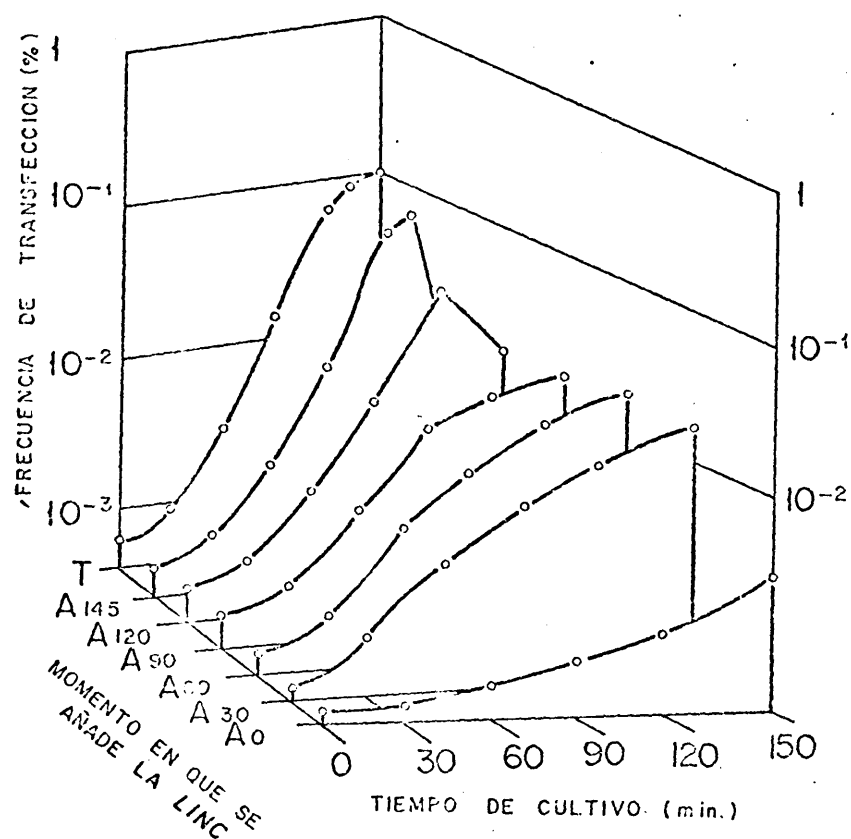


Fig. 5.- Variaciones en la estimulación de la competencia en presencia de $8 \mu\text{g/ml}$ de lincomicina (según PORTOLES y cols. 1975).

3. Síntesis de pared

Como se ha dicho previamente, en el sistema de B. subtilis, las células competentes se caracterizan por una latencia biosintética para DNA y RNA. Además de ello, estas células presentan una disminución de la síntesis de la pared bacteriana. Como consecuencia de este último hecho, las células competentes son más resistentes al tratamiento con penicilina, de modo que al someter cultivos competentes a concentraciones letales de este antibiótico se producía un aumento en las frecuencias de transformabilidad de dichos cultivos, lo que podría deberse a una muerte selectiva de las células no competentes (NESTER, 1964). Ya que la penicilina sólo actúa sobre células que se están dividiendo (HOBBY, MEYER y CHAFFEE, 1942), NESTER (1964) concluyó que las células competentes se multiplican más lentamente que las no competentes y por tanto tienen la síntesis de su pared disminuida.

GARCIA (1974) observó, empleando el sistema de estimulación de la competencia por líquidos metabólicos, que la penicilina estimulaba la competencia, cuando empleaba la misma concentración utilizada por NESTER (1964). Sin embargo, puesto que la mortalidad celular era mucho menor que en los experimentos de NESTER (1964) hay que descartar la hipótesis de una mayor sensibilidad de las células no competentes a la penicilina comparadas con las competentes. Así, la acción de la droga podría explicarse, suponiendo que al inhibir el antibiótico la formación de uniones cruzadas en el péptidoglicano de la pared celular, permitiría una mayor accesibilidad del DNA exógeno a los receptores de la membrana celular.

Por otra parte, LOPEZ y cols. (1972), estudiando el efecto de la penicilina sobre cultivos competentes crecidos en un quimostato, comprobaron que concentraciones subinhibitorias del antibiótico provocaban una estimulación de la competencia. Este efecto parece ser debido a una mayor penicilín-resistencia de las células competentes de la población, ya que estas células presentan una composición de pared diferente de la de las células no competentes. Además, estos autores comprobaron que la resistencia a la penicilina era diferente para distintos tiempos de duplicación del cultivo debido, probablemente, a que la composición de la pared varía con la tasa de multiplicación (ELLWOOD 1970).

4. Actividad autolítica

HORVATH (1968) observó que, durante el período que precede a la adquisición de la competencia, se producía un incremento en la actividad enzimática autolítica en la pared celular. Dicha actividad es debida a la N-acetil-muramil-L-alanil amidasa (localizada en la pared bacteriana), la cual actúa rompiendo los enlaces existentes entre el ácido acetilmurámico y la L-alanina, separando los péptidos de la pared celular (YOUNG y cols, 1964). Además, las estirpes poco transformables de B. subtilis tienen reducidos los niveles de enzima autolítica (YOUNG y SPIZIZEN, 1963). Estas observaciones parecen indicar que la actividad autolítica estaría correlacionada con la competencia, como ocurre en el sistema de S. pneumoniae, pero todavía no ha podido ser demostrada (YOUNG y WILSON, 1972).

Dada la importancia del papel de las autolisinas en el proceso de la transformación, dedicaremos atención especial al estudio de este tema más adelante.

5. Termorresistencia

Otro aspecto que distingue a las células competentes es su sensibilidad al calor.

McCARTHY y NESTER (1969) comprobaron que el número de transformantes disminuía el 90% cuando cultivos competentes se calentaban a 50° C durante 5 minutos, inmediatamente antes o después de la transformación. El número de transformantes viables decrecía significativamente, cuando se empleaban temperaturas que no afectaban la viabilidad de la población total, y ésta pérdida de competencia se mantenía durante unas 3 horas. McCARTHY y NESTER (1969) interpretaron estos hechos postulando la existencia de un factor sensible a la temperatura requerido para la incorporación y retención (o ambas) del DNA transformante.

Más recientemente, McDONALD (1971) ha observado que transformantes para resistencia a estreptomicina (después de haber expresado dicha resistencia fenotípicamente) son todavía sensibles a la temperatura. Por lo tanto, es difícil admitir que los fragmentos de DNA donador puedan ser eliminados por un choque térmico.

Los trabajos de ARCHER (1973), sobre el efecto del calentamiento en la viabilidad celular, han permitido demostrar que las células competentes, las precompetentes (ligeras) y las células recién transformadas son más sensibles al calor que las células no competentes de la misma población. Esta termosensibilidad es independiente del proceso de transformación.

6. Unión de proteínas a células competentes

TOMASZ y BEISER (1965) comprobaron que las células competentes, pero no las no competentes, de S. pneumoniae, contienen un antígeno al que se une un anticuerpo que inhibe la transformación. Estos anticuerpos son específicos de especie ya que no inhiben la transformación en especies no relacionadas. Dicho antígeno es una aglutinina (TOMASZ y ZANATI, 1971) sensible al tratamiento con tripsina, la cual se deposita sobre la membrana de los esferoplastos después de la unión de los factores de competencia a sus receptores celulares. Dicho antígeno ha sido también observado en el sistema de S. sanguis (PAKULA y cols., 1970).

En el sistema de H. influenzae se ha aislado un anticuerpo que inhibe la incorporación del DNA exógeno a las células competentes, debido a su unión a dichas células (BINGHAM y BARNHART, 1973). Se necesita mayor concentración de anticuerpo para bloquear la unión irreversible del DNA que para inhibir la transformación, lo cual sugiere que existe más de un tipo de anticuerpos. Aunque las células no competentes no estimulan la producción de tal anticuerpo y no adsorben la actividad contra la incorporación del DNA, eliminan algunos anticuerpos que inhiben la transformación (BINGHAM y BARNHART, 1973).

ERICKSON y cols. (1969) han observado que las células competentes del sistema transformante de B. subtilis unen preferencialmente anticuerpos contra DNA monocatenario, provocando una inhibición de la transformación. Dicha inhibición ocurre cuando el DNA se encuentra unido a las células competentes en una forma insensible a la desoxirribonucleasa exógena. Estudios

realizados con proteínas radioactivas revelan que la máxima unión de la gamma-globulina a la superficie celular ocurre inmediatamente antes de que la población alcance el máximo de competencia.

En el sistema de B. subtilis otras proteínas distintas de la gamma-globulina, tales como desoxirribonucleasa, citocromo c y seroalbúmina también se adsorben sobre la superficie celular mostrando gran afinidad por ella (ERICKSON y cols., 1969).

IV. EL PROCESO DE TRANSFORMACION BACTERIANA

La transformación bacteriana es un fenómeno en el cual las células competentes sufren cambios genéticos producidos por un DNA exógeno adicionado al medio de cultivo y que procede de bacterias muy relacionadas genéticamente con la célula receptora.

Debido a la importancia de este proceso es necesario estudiar con detalle la naturaleza del material genético donador y las distintas etapas existentes en dicho proceso transformante.

A.- CARACTERISTICAS DEL MATERIAL GENÉTICO

La transformación bacteriana difiere de otros mecanismos sexuales conocidos por el hecho de que moléculas de DNA purificadas pueden actuar como vectores en la transferencia de información genética.

El DNA extracelular puede estar en el medio de cultivo por causas artificiales (extracción química y purificación) o por causas naturales (lisis celular (OTTOLENGUI y HOTCHKISS, 1962)) o liberación de DNA procedente de células que crecen activamente (EPHRATI-ELIZUR, 1968).

1. Tamaño del DNA donador

El DNA extracelular puede estar sometido a fuerzas de degradación durante el proceso de purificación y manipulación. Esta degradación redistribuye el genoma bacteriano en un gran número de pequeños fragmentos. El tamaño del DNA transformante, en el sistema de B. subtilis, varía entre $1,2 \times 10^9$ Dalton (correspondientes aproximadamente a 700μ de longitud) (GANESAN, 1967) y $3,9 \times 10^9$ Dalton (correspondientes a unas 2000μ) (EBERLE y LARK, 1967).

BODMER (1966) obtuvo el DNA transformante por centrifugación zonal según el método de MARMUR (1961) y determinó el peso molecular del DNA bicatenario, siendo éste $2,1 \times 10^7$ Dalton. Esto significa que el genoma de B. subtilis está roto aproximadamente en 160 fragmentos con una longitud media de 10μ . Cada uno de estos fragmentos se considera como una molécula de DNA. La dimensión de una célula competente de B. subtilis es, aproximadamente, $1,4 \mu$ de longitud (JAVOR y TOMASZ, 1968) y así la reacción de unión a la superficie celular se produce entre una célula receptora y una molécula lineal de aproximadamente 7 veces su longitud.

Por otra parte es necesario que el DNA transformante tenga una longitud mínima entre 3×10^5 Dalton (CATO y GUILD, 1968) y 10^6 Dalton (SZYBALSKY y OPARA-KUBINSKA, 1966).

La degradación del DNA donador mediante tratamiento con desoxirribonucleasa o por sonicación, produce una disminución en la capacidad de incorporación y posterior integración

de dicho DNA en las células competentes de los sistemas transformantes de S. pneumoniae y H. influenzae (RANDOLPH y SETLOW, 1972; CATO y GUILD, 1968; BARNHART y HERRIOT, 1963). El efecto sobre la transformación es mayor que el detectado en la incorporación del DNA. BACH (1971) estudió la capacidad de competición de un DNA sometido a sonicación y añadido en exceso frente a pequeñas concentraciones de DNA no tratado. Empleando bajas dosis de tratamiento por sonicación observaba una menor reducción en la capacidad transformante que en la actividad competidora. Después de emplear grandes dosis, de sonicación, la capacidad competidora era más resistente que la transformante. No está claro si la capacidad competidora es una verdadera medida de la incorporación del DNA para todo el rango de pesos moleculares de DNA empleados. Sin embargo, los resultados de este autor, obtenidos para dosis altas, confirman las medidas directas de la incorporación del DNA, los cuales muestran que las etapas de la transformación que ocurren después de la incorporación son mucho más sensibles al decrecimiento de la longitud del DNA transformante.

BETTINGER y YOUNG (1975) comprobaron que células competentes de B. subtilis podían ser transformadas empleando DNA obtenido mediante lisis suave de protoplastos o formas L estables, obteniendo unas frecuencias de transformación 10 veces mayores que las obtenidas con DNA aislado por los procedimientos convencionales. Los métodos usuales implican la eliminación de la pared celular con lisozima, lisis osmótica de los protoplastos digestión con pronasa, solubilización de la membrana citoplásmica con detergentes y extracción con fenol. Todas estas etapas producen una fragmentación del DNA y eliminan casi totalmente

la presencia de RNA y proteínas. Este método clásico de obtención del DNA dificulta la demostración del ligamiento de marcadores, mientras que el DNA obtenido de lisados de formas-L permite la cotransformación de marcadores^(*) que se encuentran separados por una distancia dos, tres y hasta cuatro veces mayor que las cotransformaciones detectadas empleando DNA obtenido por los procedimientos tradicionales. Las frecuencias obtenidas con el DNA procedente de formas-L presentan unos niveles superiores a las predecibles simplemente por congresión^(**).

Estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que los protoplastos de B. subtilis lisados suavemente producen cromosomas bacterianos enteros que permanecen intactos (IVARIE y PENE, 1970). Además, BETTINGER y YOUNG (1975), comparando la frecuencia de transformación de varios marcadores respecto a un marcador simple, en función de la concentración del DNA empleado, demuestran que dichos marcadores proceden de una cadena continua de DNA incorporado.

Basándose en estos hechos, los autores postulan que una cadena del DNA, liberado de las formas-L mediante un lisado suave, penetraría en el interior de las células receptoras permitiendo una incorporación secuencial de múltiples marcadores, dando lugar a frecuencias de cotransformación altas.

(*) Cotransformación: transformación para dos o más marcadores genéticos localizados en la misma molécula de DNA.

(**) Congresión: incorporación e integración al azar de dos moléculas de DNA transformante en el mismo genoma receptor.

2. Conformación del DNA transformante

El proceso de transformación requiere la presencia de un DNA en forma nativa (ERICKSON, 1970), aunque en el sistema de S.pneumoniae, se ha comprobado que las células competentes son capaces de incorporar DNA monocatenario, pero sólo con una eficiencia menor que el 1% si se compara con la incorporación del DNA nativo (MIAO y GUILD, 1970).

M.radiodurans es capaz de incorporar con la misma eficiencia DNA nativo y desnaturalizado. Sin embargo, en los sistemas de B. subtilis y H. influenzae la incorporación de DNA monocatenario es muy baja, cuando se emplea el procedimiento habitual de transformación. Es necesario someter a los cultivos a tratamientos especiales (pH bajo o adición de 10^{-3} M de EDTA) para inducir la incorporación y posterior transformación, empleando DNA desnaturalizado, con una eficiencia mucho mayor que en cultivos no tratados. En estas condiciones experimentales la transformación con DNA nativo es inhibida (POSTEL y GOODGAL, 1967).

El EDTA no parece ser necesario para lograr la transformación, en el sistema de B. subtilis cuando se emplean concentraciones elevadas de DNA monocatenario. En estas experiencias, si se adiciona calcio, se elimina la transformación con dicho DNA. Este hecho parece indicar que, en este sistema, el EDTA favorece la transformación por acomplejar los cationes necesarios para la acción de las nucleasas que degradan el DNA desnaturalizado (TEVETHIA y MANDEL, 1970).

De forma similar un pH de 6,1 reduce la actividad de tales nucleasas e incrementa la transformabilidad con DNA monocatenario (TEVETHIA y MANDEL, 1971). La transformación con DNA nativo en presencia de EDTA es también mayor a pH de 6,1 debido, probablemente, a que dicho agente quela muy poco magnesio, a este pH, siendo este catión requerido para la transformación (NOTANI y SETLOW, 1974).

Hay algunas evidencias de que, en el sistema de B. subtilis, los mecanismos de incorporación de DNA nativo y monocatenario son similares, ya que la incorporación relativa de las dos formas de DNA es igual para distintos estados en el desarrollo de la competencia. Además, estas dos formas del DNA donador pueden competir entre sí en la transformación y, finalmente, las mismas células pueden ser transformadas al mismo tiempo por ambas formas de DNA (TEVETHIA y CAUDILL, 1971). La existencia, en el sistema de H. influenzae, de mutantes que unen preferencialmente DNA monocatenario sugiere que en esta especie el mecanismo de incorporación de los dos tipos de DNA puede ser diferente (CASTER y cols., 1970).

3. El ácido ribonucleico como molécula donadora

Además de las transformaciones realizadas con DNA desnaturalizado ha sido descrita "transformación" con ácido ribonucleico (RNA) tanto en el sistema de B. subtilis como en el de S. pneumoniae.

Los estudios realizados en B. subtilis muestran un incremento temporal en la actividad penicilinásica de una es-

tirpe inducible como respuesta a la exposición, de las células competentes a material que contenía RNA procedente de una estirpe constitutiva. Similares extractos procedentes de la estirpe inducible, que no está inducida, eran inactivos (CSANYI y cols. 1961). RNA purificado con fenol o con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico era biológicamente activo (KIRTIKAR y DUERKSEN, 1968 a). Además, el tratamiento de las células competentes con ribonucleasa, antes de la exposición a RNA, aumentaba la incorporación de dicho polinucleótido. También la actividad "transformante" del RNA era disminuida al adicionar RNA de E. coli, probablemente debido a competición en la incorporación (KIRTIKAR Y DUERKSEN, 1968 b). Realizando gradientes de equilibrio, dichos autores observaron un pico pequeño, con sensibilidad a la ribonucleasa, en la posición del RNA monocatenario y una banda mayoritaria que podría ser RNA bicatenario o un híbrido RNA-DNA, ya que la actividad era eliminada por RNasa, sólo cuando el tratamiento enzimático era precedido por calentamiento.

S. pneumoniae sensible a ácido p-aminosalicílico o sulfanilamida es transformado temporalmente para la resistencia a dichas drogas por preparaciones sensibles a RNasa procedentes de S. pneumoniae resistente a dichas sustancias, pero no lo eran con preparaciones procedentes de células sensibles (EVANS, 1964). Como las preparaciones purificadas, incluyendo híbridos artificiales de RNA de células resistentes y DNA de células sensibles, eran inactivadas por ribonucleasa y desoxirribonucleasa se concluyó que el material activo era un híbrido DNA-RNA. Así, solamente el RNA unido al DNA podría entrar en células competentes de S. pneumoniae.

De estos hechos se concluye que, en el sistema de B. subtilis, pueden penetrar pequeñas cantidades de DNA monocatenario, y que las moléculas híbridas de DNA-RNA pueden entrar tanto en células de B. subtilis como en S. pneumoniae.

4. Incorporación de polinucleótidos sintéticos

Por otra parte CIFERRI y cols. (1970) observaron que B. subtilis era capaz de incorporar polidesoxirribonucleótidos, pero no polirribonucleótidos o polímeros híbridos (poli (rA-dT) y poli (rU) acomplejados con DNA monocatenario). Sin embargo, no se observaba competición por transformación con poli(dC-dG) o poli (dA-dT) añadidos a una concentración diez veces mayor que la cantidad de DNA transformante. Por su parte, H. influenzae muestra una pequeña, pero reproducible, disminución de la transformación por el mismo tipo de polidesoxirribonucleótidos añadido con el mismo exceso de concentración (SETLOW y cols, 1965) sugiriendo que estos polímeros sintéticos pueden entrar en las células competentes. Similares datos de competición han sido obtenidos en el sistema de S. pneumoniae con poli (dA-dT), poli (dG-dC) y poli (d(A-T)) (TOMASZ, 1973a). La estirpe competente Challis de S. sanguis pierde su viabilidad por la adición de poli (d(A-T)) de Cancer magister, lo cual parece indicar una incorporación de dicho polímero (PIECHOWSKA y SHUGAR, 1967).

B.- ETAPAS DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN

La transformación bacteriana es un fenómeno muy complejo, dentro del cual pueden distinguirse varios pasos sucesivos: adsorción, penetración, eclipse, integración y expresión. Un resumen de este proceso se ilustra en la figura 6.

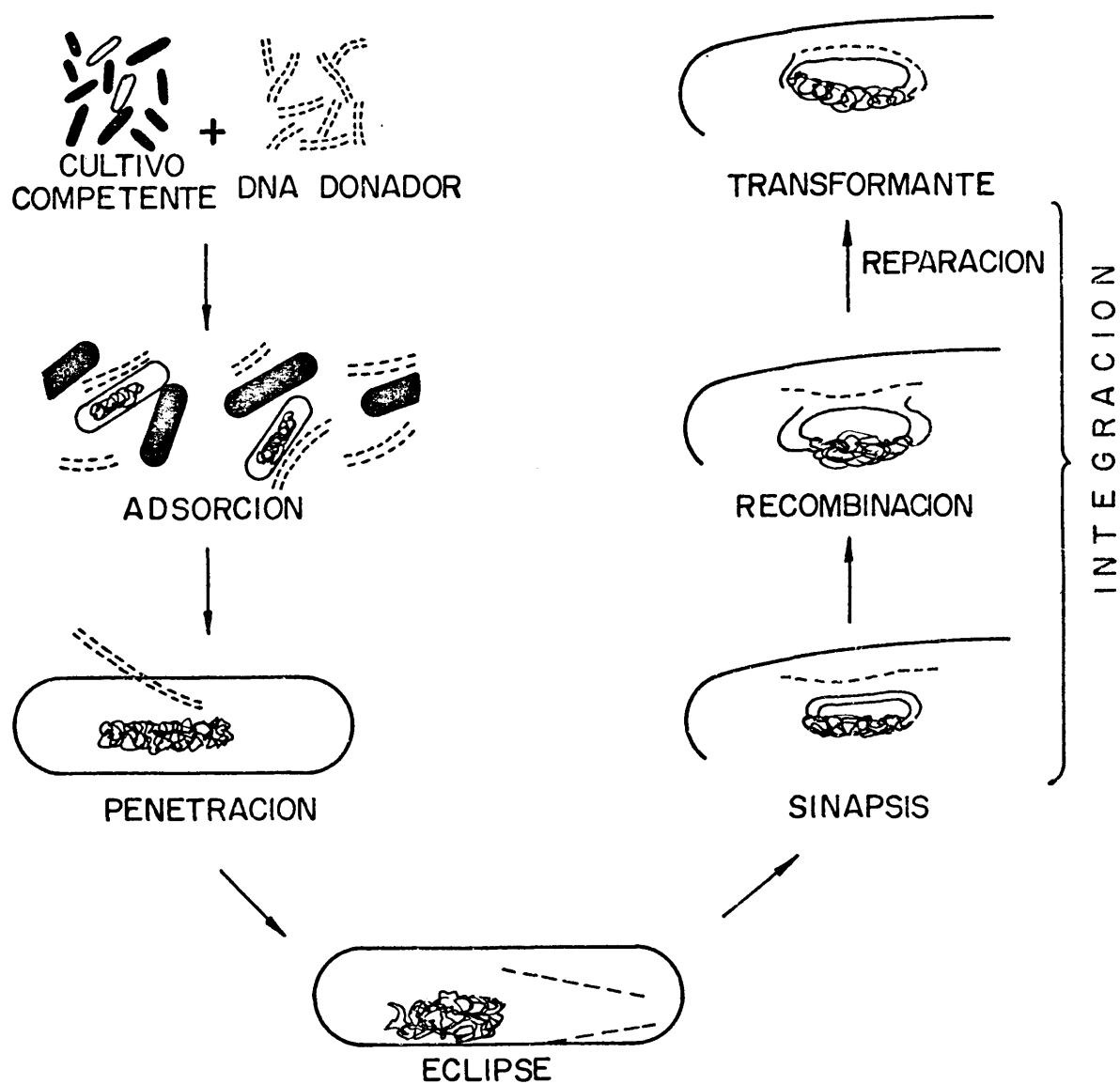


Fig. 6.- Distintas etapas implicadas en el proceso de transformación.

1. Adsorción

El proceso transformante se inicia con la unión del DNA donador a la superficie de la célula competente, poco después de la adición de dicho DNA (LEVINE y STRAUSS, 1965). La unión de este DNA es susceptible a agentes externos tales como la desoxirribonucleasa I, pero no al lavado. Experimentalmente, es posible determinar la cantidad de DNA unido expresada como el componente del complejo formado por el DNA donador, asociado a la célula competente que es susceptible a la desoxirribonucleasa pancreática I añadida externamente (LACKS, 1977).

El DNA donador se fija a la superficie celular por un extremo (DUBNAU y CIRIGLIANO, 1972) realizándose este proceso con gran rapidez (LEVINE y STRAUSS, 1965).

La unión del DNA parece depender del pH, fuerza iónica y cationes divalentes presentes en el medio (BARNHART y HERRIOTT, 1963). Estos hechos sugieren que esta fijación inicial ocurre sólo por una interacción iónica con grupos cargados de la superficie celular. Esta hipótesis está también apoyada por la circunstancia de que este proceso no parece requerir energía (BARNHART y HERRIOTT, 1963). La cantidad de DNA unido es considerablemente grande si se compara con la cantidad de moléculas de DNA que pueden ser incorporadas por las células y, de este modo, la mayoría de las moléculas unidas pueden ser eliminadas de la superficie celular.

En el sistema de S. pneumoniae, cabe distinguir dos fases dentro de la etapa de unión: la denominada unión superfi-

cial y la unión profunda (SETO y TOMASZ, 1975 a). Por su parte, en el sistema de B. subtilis, BUITENWERF y VENEMA (1977) parecen distinguir dos etapas dentro del proceso, una independiente de la temperatura y otra dependiente de ella. Debido a la importancia que la fase de unión en el proceso de transformación tiene para la parte experimental de esta Tesis, otros aspectos del tema serán desarrollados con más detalle en un capítulo posterior.

2. Penetración

El DNA unido transitoriamente en la fase anterior representa un estado intermedio que precede a su entrada en el interior de las células competentes (LERMAN y TOLMACH, 1957).

LACKS y GREENBERG (1976) han sugerido que la incorporación del DNA unido a la superficie celular, en el sistema de S. pneumoniae, está producida por una nucleasa que hidroliza una de las cadenas del DNA bicatenario donador, mientras que, la otra cadena es introducida en el interior de la célula receptora, actuando dicha nucleasa como una DNA-translocasa. El DNA alcanza un estado de unión irreversible a la célula competente, no pudiendo ser eliminado por tratamiento con desoxirribonucleasa I (DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1973 a). Este proceso presenta un pH óptimo, es dependiente de la temperatura y requiere una fuente de energía (BARNHART y HERRIOTT, 1963). Según TICHY (1972), en el sistema de B. subtilis, es necesaria una síntesis de proteínas de novo, tanto para la unión del DNA, como para su penetración.

Por otra parte, el DNA unido irreversiblemente a las células competentes parece estar «complejado con un componente

celular, probablemente perteneciente a la membrana (HARRIS y BARR, 1971 b; PIECHOWSKA y FOX, 1971).

La complejidad de esta fase de la transformación requiere un estudio más detallado, que será realizado en el capítulo siguiente.

3. Destino del DNA transformante después de la penetración.

Las etapas posteriores a la incorporación del DNA exógeno en la célula receptora, previas a su expresión fenotípica, se detallan a continuación.

a) Eclipse. En el sistema de B. subtilis, el DNA transformante, poco después de la entrada en el interior de la célula competente, muestra un decrecimiento en su actividad biológica, cuando se reextrae y se utiliza como DNA donador para transformar un segundo cultivo competente (VENEMA y cols, 1965). Este período de pérdida de actividad ha sido denominado fase de eclipse. En el sistema de S. pneumoniae se ha detectado muy poca actividad de los marcadores donadores en el DNA transformante aislado poco después de la fijación (FOX y HOTCHKISS, 1960; GHEI y LACKS, 1967), indicando que en este sistema existe también una fase de eclipse. Realizando experiencias similares con H. influenzae, VOLL y GOODGAL (1961) comprobaron que, en este sistema, dicha fase no se produce.

Los trabajos realizados por LACKS y cols. (1967) mostraron que, durante la fase de eclipse, en el sistema de S. pneumoniae, el DNA se encuentra en forma monocatenaria. Posterior-

mente, MORRISON (1977) ha comprobado que este DNA desnaturalizado forma un complejo que puede ser disociado por tratamiento con dodecilsulfato sódico, sosa, cloroformo y proteinasa K, pero que es insensible a la ribonucleasa. Este complejo parece ser muy estable, y podría ser un precursor en el proceso de recombinación. En primer lugar, la estructura unida al DNA podría promover la progresiva transferencia de una cadena del DNA en el interior de la célula. En un paso posterior, dicha estructura, podría proteger al DNA, después de su incorporación, frente a la acción de las endo- y exonucleasas y, finalmente, podría facilitar la integración manteniendo las bases de dicho DNA frente a las bases complementarias del cromosoma bacteriano, para que se produzca dicha integración.

Complejos similares han sido detectados en el sistema de S. sanguis por RAINA y RAVIN (1977). El DNA donador aparece unido a algún componente celular, que lo hace resistente a la degradación nucleolítica por desoxirribonucleasa exógena y ha perdido su capacidad transformante.

En el sistema de B. subtilis ha existido gran controversia acerca de si el DNA transformante se encontraba en forma nativa o monocatenaria después de la incorporación.

Estudios realizados sobre las propiedades del DNA donador después de ser reextraído (BODMER y GANESAN (1964) y DUBNAU y CIRIGLIANO (1972)) mostraban la existencia de moléculas donadoras no integradas, en formas bicatenaria y monocatenaria, mientras que PENE y ROMIG (1964) encontraron el DNA en forma bicatenaria. PIECHOWSKA y FOX (1971) detectaron formas de DNA monocatenario complejo con componentes celulares que provo-

caban una modificación de la densidad de flotación de dicho DNA. Por otra parte, HARRIS y BARR (1971 b) observaron una forma parcialmente monocatenaria del DNA unida a la membrana.

Los resultados obtenidos por PIECHOWSKA y FOX (1971) mostraban que el tratamiento de los complejos DNA-componentes celulares con pronasa a 70°C o el calentamiento en presencia de concentraciones elevadas de sales, liberaba DNA monocatenario de las estructuras celulares, lo que puede ser detectado al determinar su densidad de flotación en gradientes de cloruro de cesio a un pH de 11,2. Estos hechos parecían indicar que el DNA transformante, después de ser incorporado en el interior de la célula receptora, se encontraba en una forma monocatenaria asociada a componentes celulares.

Sin embargo ARWERT y VENEMA (1973 a), empleando lisados de B. subtilis que habían sido expuestos a DNA transformante durante diez minutos, observaron que el tratamiento con pronasa a 45° C producía fragmentos de DNA bicatenario. Estos hechos les llevaron a poner en duda los resultados de PIECHOWSKA y FOX (1971), sugiriendo que el DNA complejo con los componentes celulares, detectados por dichos investigadores, se encontraría en forma bicatenaria, pero al ser sometido a temperaturas elevadas o a pH alto sufriría una desnaturalización convirtiéndose en monocatenario. Basándose en estos datos, ARWERT y VENEMA (1973 a) postularon que la fase de eclipse estaría causada por la producción de fragmentos de DNA bicatenario de peso molecular relativamente bajo.

DUBNAU y CIRIGLIANO (1972) detectaban, poco después de la incorporación del DNA exógeno, la existencia de fragmentos de DNA bicatenarios y monocatenarios. Estos autores observaron que los fragmentos bicatenarios reaislados presentaban una actividad transformante del 1 al 2% si se comparaba con la

actividad del DNA donador y además, no poseían actividad recombinante, ni actividad transformante para los marcadores del DNA receptor. Estos fragmentos bicatenarios poseían un peso molecular de $3-4 \times 10^6$ Dalton, siendo similares a los detectados por VENEMA y cols. (1965) en la denominada fase de eclipse.

DUBNAU y CIRIGLIANO (1972) postularon que estos fragmentos bicatenarios estarían situados en el espacio periplásmico durante la fase de eclipse y, posteriormente, sufrirían una degradación exonucleolítica de una de sus cadenas, pasando la otra cadena al interior del citoplasma de la célula donde ocurriría el proceso de integración. Los fragmentos monocatenarios detectados por estos autores, poco después de la incorporación (de un peso molecular de 1 a 2×10^6 Dalton) serían simplemente fragmentos de degradación y no serían intermediarios en el proceso de integración.

Un año después, experimentos realizados en este mismo laboratorio (DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1973 a, 1973 b) permitieron dilucidar el verdadero estado del DNA en la fase de eclipse y en las etapas posteriores. Estos autores analizaron el DNA expuesto durante períodos de tiempo muy cortos a las células competentes, comprobando que los fragmentos bicatenarios de DNA, descritos en su trabajo previo, eran sensibles al tratamiento con desoxirribonucleasa I (correspondían a una fase de unión reversible de dicho DNA a las células competentes) apareciendo ya a los 30 segundos de haber adicionado el DNA al cultivo. Estos fragmentos no podían corresponder a complejos DNA donador - DNA receptor, puesto que dichos complejos no aparecen hasta después de 3 minutos de contacto. Sin embargo, los fragmentos de DNA monocatenario aparecían entre los 30 segundos y los 2 minutos después de la exposición al DNA transformante,

siendo insensible al tratamiento con desoxirribonucleasa I.

A la vista de estos resultados, dichos autores postularon que el DNA transformante penetraría en el interior de la célula en forma monocatenaria y sufriría a continuación la fase de eclipse. Posteriormente, comenzarían a formarse los complejos donador-receptor coincidiendo con la desaparición de los fragmentos monocatenarios.

Contrariamente a lo que ocurre en los sistema de S. pneumoniae y B. subtilis, H. influenzae no presenta una fase de eclipse (VOLL y GOODGAL, 1965). Por otra parte, la actividad de los marcadores presentes en el DNA donador decrece con el tiempo hasta llegar al 25-40% de su valor inicial (STUY, 1965). Este decrecimiento parece ser debido, parcialmente, a la integración del DNA donador y también puede ser debido, en parte, a degradación monocatenaria previa a la integración.

b) Integración. Después de que ha tenido lugar la etapa de eclipse, el DNA transformante se integra en el cromosoma bacteriano.

Para que se produzca el proceso de integración, es necesario que haya un apareamiento entre las bases del DNA donador y las bases complementarias del cromosoma bacteriano. El DNA donador, por ser monocatenario, presenta sus bases expuestas, pero la naturaleza bicatenaria del DNA receptor impide la exposición de sus bases. Sin embargo, puede pensarse en varias posibilidades que permitan el apareamiento del DNA mono-

catenario con el DNA de la célula huésped: a) rupturas entre una serie de bases a cortas distancias (TEITELBAUM y ENGLANDER, 1975); b) apertura de la doble hélice por proteínas específicas asociadas al DNA, lo que produce la disminución del punto de fusión del DNA bicatenario (ALBERTS y FREY, 1960) o por enzimas desnaturalizantes del DNA (ABDEL-MONEM y cols, 1977) y c) la presencia de regiones monocatenarias en el cromosoma receptor, ya que el 5% del DNA de la célula huésped es monocatenario (HARRIS y BARR, 1969; HARRIS y BARR, 1971 a, PIECHOWSKA y cols, 1977).

El proceso de integración del DNA transformante presenta una primera etapa de sinapsis, consistente en un apareamiento entre el DNA donador y el cromosoma bacteriano (POPOWSKY y VENEMA, 1977). Ha sido comprobado por POPOWSKY y VENEMA (1977) que , en el sistema de B. subtilis, poco después de la incorporación, el DNA donador monocatenario aparece asociado con el cromosoma receptor formando un complejo lábil, que puede ser estabilizado por la exposición de las células transformantes a condiciones que permiten la formación de uniones covalentes en el DNA. Estos complejos, ya habían sido previamente descritos (DUBNAU y DAVIDOFF-ABELSON, 1971), recibiendo el nombre de complejos donador-receptor "abiertos", en los cuales la molécula donadora se encuentra unida al DNA receptor por uniones no covalentes, teniendo baja actividad transformante para los marcadores donadores.

Estos complejos pueden ser similares a los complejos iniciales de recombinación producidos por HOLLOMAN y cols. (1975) empleando DNA monocatenario y DNA superhelicoidal del bacteriófago ϕ X174. Estos autores observaron que el DNA superhelicoi-

dal era capaz de integrar DNA monocatenario homólogo, pero no heterólogo. Ya que el cromosoma de seres procarióticos puede ser obtenido con un grado elevado de superhelicoidalidad (WORCEL y BURGI, 1972), es posible que el mecanismo productor de la sinapsis entre el DNA donador y el cromosoma bacteriano, sea similar al descrito por HOLLOMAN y cols (1975). Sin embargo, la sinapsis del DNA monocatenario con el DNA superhelicoidal in vitro es mucho más baja que la obtenida con DNA monocatenario en el proceso de transformación. Por esta razón, es probable que algunas proteínas sean necesarias para incrementar la proporción de DNA monocatenario apareado. Apoya esta hipótesis el hecho de que la integración de DNA monocatenario por DNA del bacteriófago ϕ X174 es promovida por algún componente de los esferoplastos de E. coli. Es muy probable que las células competentes de B. subtilis contengan proteínas que promueven específicamente la formación de complejos iniciales de recombinación. Dicha proteína podría ser la detectada por EISENSTADT y cols. (1975), la cual se une específicamente a DNA monocatenario.

Un paso posterior en el proceso de integración del DNA monocatenario es la formación de rupturas en la cadena del cromosoma bacteriano que no se ha apareado con el cromosoma receptor. Después, la región del DNA donador apareado puede ser elongada por la asimilación de los fragmentos sobrantes del DNA receptor producidos por una exonucleasa similar a la exonucleasa λ observada por CASSUTO y RADDING (1971).

Por otra parte, existe una posibilidad alternativa para el apareamiento del DNA donador y el DNA cromosómico, ya

que en el cromosoma bacteriano existen regiones monocatenarias (HARRIS y BARR, 1969; 1971 a; y PIECHOWSKA y cols. 1977). Además, en el sistema de transformación de H. influenzae se requiere la presencia de regiones monocatenarias en el cromosoma receptor para la integración. LeCLERC y SETLOW (1975) mostraron que un mutante incapaz de formar complejos donador-receptor carecía de regiones monocatenarias en su cromosoma.

No existe información sobre el tamaño de las regiones monocatenarias en el cromosoma de B. subtilis. Si el tamaño de estas regiones es mucho mayor que los segmentos de DNA donador finalmente integrados, no hay necesidad de recurrir a la teoría de un desplazamiento de DNA monocatenario, o a la digestión de la cadena sobrante. Por otra parte, si las regiones monocatenarias del DNA receptor son más pequeñas que los fragmentos integrados del DNA donador, una integración completa requeriría el desplazamiento y/o la digestión de la cadena receptora.

Los trabajos realizados por BUITENWERF y VENEMA (1977) apoyan la hipótesis de que, para la integración, es necesaria una digestión del DNA sobrante de la célula huésped. Estos autores observaron que al tratar los complejos donador-receptor con nucleasa S1 -que actúa específicamente sobre DNA monocatenario (ANDO, 1966; WIEGAND y cols, 1975)- se producía una liberación de segmentos del DNA donador. Además, esta liberación disminuía en condiciones que permitían la formación de complejos donador-receptor a una densidad de flotación normal. Asimismo, el efecto de la nucleasa S1 sobre la actividad de los recombinantes y sobre los marcadores del DNA donador disminuía si el tratamiento se realizaba a 30° C (condición que permite que la recombinación llegue a término). A la vista de estos hechos, los autores con-

sideran la posibilidad de que el DNA donador tenga fragmentos monocatenarios que no se han apareado en el complejo donador-receptor. Existirían así dos posibles modelos del complejo: en uno de ellos (Fig. 7A) los dos extremos del DNA donador apareados serían monocatenarios. En el otro (Fig. 7B) la porción monocatenaria del DNA donador estaría limitada a uno solo de los extremos de la región apareada.

Ambas estructuras explicarían las observaciones acerca de que el complejo donador-receptor libere fragmentos de DNA donador al ser tratado con nucleasa S1. Además, los dos modelos darían lugar a la formación de complejos en los cuales el DNA donador está completamente apareado con la cadena receptora complementaria, sólo con que se produzca una migración del DNA donador (LEE y cols, 1970; RADDING, 1973). Sin embargo, parece más lógico un modelo de recombinación en el cual la asimilación del DNA donador sea efectuada por la digestión del DNA receptor sobrante, ya que, a 17° C, el complejo no está sometido a cambios sustanciales. Además, el mutante 7G84 (mutante de B. subtilis incapaz de transformarse) no sufre la conversión del complejo donador-receptor temprano al complejo definitivo, sugiriendo una base enzimática para la asimilación del DNA donador. Por otra parte, como se ha dicho previamente, en el sistema vegetativo de recombinación del fago λ , actúa una exonucleasa que elimina el DNA sobrante del fago (CASSUTO y cols, 1971).

Por tanto, si la asimilación del DNA donador es efectuada por una nucleasa similar a la exonucleasa λ (que actúa en los extremos 5' del DNA donador), no parece probable el modelo propuesto en la Fig. 7A, ya que sólo la parte que lleve extremos 3' del DNA donador podrían ser asimiladas. La eliminación de las partes del DNA que llevan extremos 5' deberían efectuarse enton-

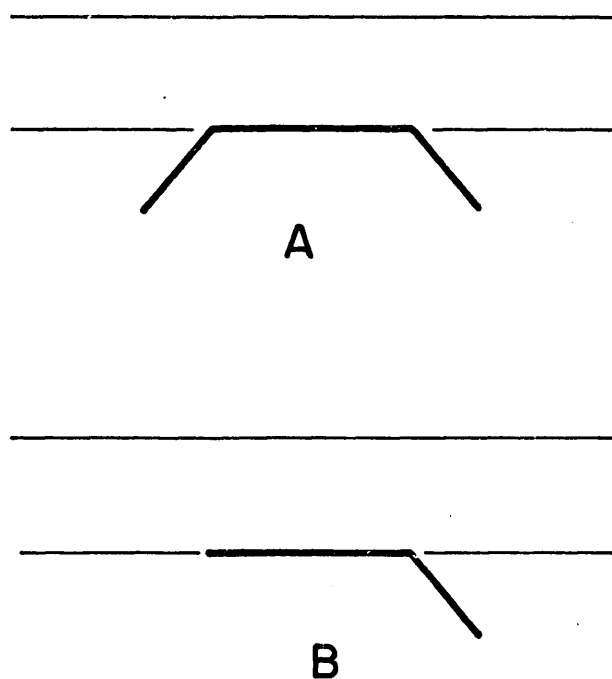


Fig. 7.- Modelos de la formación del complejo entre DNA donador y DNA receptor (según BUITENWERF y VENEMA, 1977). Representación esquemática de complejos donador-receptor en los cuales la molécula donadora es parcialmente monocatenaria. — : DNA receptor; — : DNA donador.

ces por una segunda nucleasa. Este hecho no concordaría con la observación de que la longitud de los segmentos integrados del DNA donador es aproximadamente la misma que los fragmentos monocatenarios presentes en la célula antes de la formación de los complejos donador-receptor (DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1973a)

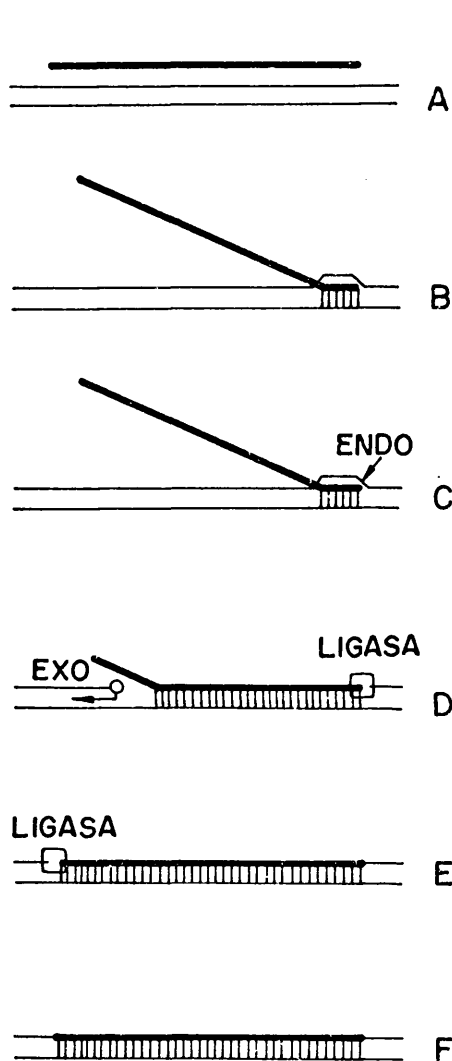
En base a estas consideraciones, BUITENWERF y VENEMA (1977) suponen que la estructura más probable es la señalada en la Fig. 7 B. Esta estructura concuerda con la observación de que la mayor parte del DNA donador, presente en los complejos y que presenta elevada densidad de flotación, sedimenta en gradientes alcalinos de sacarosa en la misma posición que el DNA receptor. Este hecho puede ser entendido si se supone que se producen uniones covalentes entre los extremos del DNA donador y el DNA receptor, al mismo tiempo que el DNA receptor sobrante va siendo degradado. La observación de que el DNA donador y los marcadores del DNA receptor pueden estar ligados en el complejo intermedio apoyan esta hipótesis (BUITENWERF y VENEMA, 1977).

Después de que el DNA donador se ha apareado en toda su longitud con el cromosoma receptor, se producen uniones covalentes entre la molécula donadora y el DNA receptor. Dependiendo de la estructura del complejo intermedio, actúan la DNA polimerasa y la DNA ligasa, o sólo esta última, para convertir dicho complejo en una molécula heteroduplex covalentemente unida. Existe evidencia, en el sistema de B. subtilis, de que se necesita la DNA ligasa para que se produzca una integración completa. ARWERT y VENEMA (1973 b) demostraron que la conversión de un intermediario en la recombinación (con poca actividad biológica) en un complejo donador-receptor (con gran actividad biológica) puede ser efectuado por una ligasa.

El producto final de la integración, en el sistema de B. subtilis, es un heteroduplex de DNA donador y DNA receptor con segmentos monocatenarios insertados que poseen un peso molecular de $2,8 \times 10^6$ Dalton (DUBNAU y CIRIGLIANO, 1972; FORNILLI y FOX, 1977). Recientemente, ha sido visualizado, por microscopía electrónica, el DNA integrado en B. subtilis (FORNILLI y FOX, 1977).

Teniendo en cuenta todos los hechos previamente descritos, BUITENWERF (1977) ha propuesto un modelo para la integración del DNA donador durante el proceso de transformación (Fig. 8). Un segmento del DNA donador encuentra una parte homóloga del DNA receptor, posiblemente superhelicoidal, y forma un complejo inestable con el DNA receptor. La formación del complejo puede ser promovida por proteínas específicas. A continuación, una endonucleasa produce una rotura en la cadena del DNA receptor no apareada, en el extremo opuesto al lugar en el que se está produciendo el apareamiento del DNA donador. La posterior asimilación del DNA donador es facilitada por una exonucleasa similar a la exonucleasa λ , que elimina el DNA receptor sobrante. Al mismo tiempo que se produce la digestión de este DNA, la DNA-ligasa va uniendo el extremo opuesto del DNA donador, al DNA receptor. Después de que se ha realizado un apareamiento completo, la DNA-ligasa une el extremo del DNA donador al DNA receptor, produciéndose una molécula heteroduplex covalentemente unida.

Otro punto importante en la integración del DNA exógeno es la localización topográfica de dicho proceso. PIECHOWSKA y FOX (1971) observaron la presencia de DNA monocatenario unido a una o más proteínas celulares después de su incorporación, y



Un segmento monocatenario del DNA donador encuentra el DNA receptor bicatenario superhelicoidal

La integración se inicia por la formación de un complejo inestable entre el DNA donador y el receptor

La asimilación del DNA donador se inicia por la acción de una endonucleasa.

La posterior asimilación del DNA donador se facilita por una exonucleasa que elimina la parte sobrante del DNA receptor, mientras que una DNA-ligasa establece una unión covalente entre un extremo del DNA donador y el receptor.

Después de completarse el apareamiento, la DNA-ligasa une covalentemente el otro extremo del DNA donador con el receptor.

El producto final de la recombinación es un heteroduplex del DNA donador y el receptor.

Fig. 8.- Modelo molecular de la recombinación durante la transformación (según BUITENWERF, 1977).

sugieran la posibilidad de que dichas proteínas intervinieran en la formación del complejo donador-receptor.

DOOLEY y NESTER (1973) observaron que la mayor parte del DNA donador se encontraba unido a la membrana bacteriana, después del proceso de incorporación, en una forma diferente a como se halla el genoma bacteriano (que también presenta asociación con la membrana citoplásmica). El DNA donador era eliminado de la membrana por sonicación con más dificultad que el DNA receptor y, además, dicho DNA donador era eliminado preferencialmente de la membrana por tratamiento con detergentes no iónicos o con temperaturas elevadas. Estos autores explican sus resultados considerando que el bajo peso molecular que poseen los fragmentos donadores les permite una mayor resistencia al tratamiento por sonicación. Además, si el DNA donador poseyera mayor número de uniones a la membrana por unidad de superficie que el genoma receptor podría ser más fácilmente eliminado de la membrana por tratamiento con calor o detergentes. DOOLEY y NESTER (1973) sugieren que los procesos de apareamiento y recombinación deben ocurrir en la membrana o en una zona muy próxima a ella. La recombinación debe ocurrir en este lugar, simplemente porque el DNA transformante se mantiene en la membrana mientras los enzimas solubles actúan en el proceso o, alternatively, porque la membrana actúa como una matriz unificante mientras un sistema de enzimas asociados a ella participa en la integración de los fragmentos donadores, de un modo similar a lo que ocurre en los sistemas de replicación asociados a la membrana (STRATLING y KNIPPERS, 1971).

c) Estudios genéticos de la integración. El aislamiento y caracterización de mutantes para las distintas etapas del proceso transformante ha resultado ser una herramienta de gran utilidad para estudiar las distintas fases implicadas en dicho proceso.

En los estudios sobre la integración de DNA exógeno en el cromosoma receptor, se han empleado mutantes deficientes en la transformación. Estos mutantes, incapaces de llevar a cabo el proceso de recombinación, son capaces de incorporar DNA, pero no de producir transformantes y se denominan estirpes rec⁻. Este efecto puede estar localizado a diferentes niveles: presináptico, postsináptico o a nivel de recombinación sensu strictu. En el sistema de B. subtilis, han sido detectados mutantes incapaces de producir los complejos donador-receptor y mutantes capaces de formar los complejos donador-receptor, pero que no producían nunca transformantes (DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1971). Además, han sido aislados mutantes deficientes en la recombinación que están afectados en su capacidad para producir complejos donador-receptor (BUITENWERF y VENEMA, 1977). Dentro de este tercer tipo de mutantes pueden ser distinguidos 5 grupos diferentes:

- 1) mutantes que no producen complejos en cantidad detectable ;
- 2) mutantes que no pueden convertir los intermedios de la recombinación (complejos iniciales) en complejos normales; 3) mutantes que producen menor cantidad de complejos que la estirpe salvaje; 4) mutantes que producen pequeñas cantidades de complejos aberrantes y 5) mutantes que producen complejos donador-receptor sin uniones covalentes entre el DNA donador y el receptor.

Por otra parte, DUBNAU y CIRIGLIANO (1974) y MAZZA y cols (1975) han observado la existencia de varios loci mutantes que interfieren con la recombinación en el proceso de transformación. MAZZA y cols. (1975) han demostrado la existencia de 10

loci diferentes implicados en la transformación genética.

En el sistema de H. influenzae, también han sido detectados mutantes que tienen bloqueado un paso temprano en la transferencia de DNA donador al DNA receptor (NOTANI y cols, 1972; POSTEL y GOODGAL, 1972). Uno de estos mutantes, denominado rec 2, con una eficiencia de transformación de 10^{-7} comparada con la estirpe salvaje, no promueve la recombinación del DNA fágico (SETLOW y cols, 1972), aunque otro mutante de este tipo (KB6) es normal a este respecto. En los dos mutante, rec 2 y KB6, el DNA donador, después de la incorporación, permanece sin ser degradado y no se producen complejos donador-receptor. En otra clase de mutantes se producen complejos donador-receptor covalentemente unidos (POSTEL y GOODGAL, 1972), pero el DNA extraído de las células transformadas no presenta actividad transformante de recombinantes. Por otra parte, DNA donador marcado radioactivamente y extraído de los complejos donador-receptor de mutantes rec 1 no transforma para los marcadores donadores, aunque es capaz de formar complejos (NOTANI y cols, 1972). Otro mutante de H. influenzae forma sólo del 20 al 60% de moléculas recombinantes comparado con la estirpe salvaje, pero es transformado menos eficientemente que el tipo salvaje (en casi tres órdenes de magnitud) (KOOISTRA y VENEMA, 1973).

Existe otro tipo de mutantes de H. influenzae que se transforma mejor para un solo marcador que para marcadores ligados. El marcaje de DNA donador con deuterio (DNA pesado) asociado con DNA receptor ligero es detectado sólo en la posición del DNA ligero, lo cual sugiere que dicho mutante integra trozos de DNA transformante más pequeños que lo normal (CASTER y GOODGAL, 1972).

En el sistema de S. pneumoniae ha sido detectado un mutante que carece de la desoxirribonucleasa dependiente del ATP y dicho mutante transforma con una eficiencia de sólo un sexto comparada con el tipo salvaje. Sin embargo, es capaz de formar una cantidad normal de los complejos donador-receptor (VOVIS, 1973). Estas observaciones sugieren que la nucleasa dependiente del ATP actúa en un paso tardío de la recombinación, posiblemente eliminando el DNA sobrante de los complejos.

Tres mutantes de H. influenzae deficientes en dicho enzima transforman normalmente, indicando que este enzima no es requerido para la recombinación en el sistema de H. influenzae. Una conclusión parecida ha sido postulada en el sistema de B. subtilis, ya que mutantes rec⁻ poseen niveles normales del enzima dependiente del ATP. Dichos mutantes forman complejos donador-receptor normales, o complejos con actividad transformante disminuída para los marcadores donadores, o bien son incapaces de formar complejos donador-receptor (DUBNAU y cols, 1973). Sin embargo, otros autores han detectado mutantes deficientes en nucleasa dependiente del ATP que son poco transformables tanto en el sistema de H. influenzae, como en el de B. subtilis (GRETH y CHEVALIER, 1973; CHESTUKHIN y cols, 1972), lo cual parece indicar que dicho enzima es requerido en el proceso de recombinación en los tres sistemas de transformación (S. pneumoniae, B. subtilis y H. influenzae) .

4. Expresión fenotípica.

Una vez que el DNA donador se ha integrado, es necesario que los nuevos marcadores se expresen. Aunque después de 45 minutos, ya ha finalizado la integración del DNA, es indis-

pensable que transcurran de 2 a 4 horas para que las células transformadas expresen fenotípicamente los marcadores integrados (NESTER y STOCKER, 1963; VENEMA y cols. 1965). Este período de tiempo previo a la aparición de transformantes es denominado expresión latente. Esta fase de latencia ha sido detectada en el sistema de B. subtilis, pero no parece existir en el sistema de S. pneumoniae (LACKS y HOTCHKISS, 1960).

A pesar de que los genes recién integrados atraviesan un período de expresión latente, algunos de los genes de la célula receptora mantienen actividad metabólica. Las células recién transformadas sintetizan proteínas y RNA mensajero de vida corta, mientras que la síntesis de RNA estable y DNA está reducida (McCARTHY y NESTER, 1967).

KAMMEN y cols. (1966) comprobaron que, en el sistema de B. subtilis, las células recién transformadas requieren la presencia de aminoácidos no esenciales. Por tanto, parece que la expresión fenotípica requiere la síntesis de polipéptidos. Dicha síntesis no está dirigida por el RNA, ya que las células recién transformadas son resistentes al tratamiento con actinomicina D o puromicina. Además, la adición de 5-fluorouridina, inhibidor de la síntesis de los mucopéptidos de la pared celular, en ausencia de dichos aminoácidos no esenciales, causa la muerte preferencial de los transformantes. Este hecho parecía indicar que la síntesis de polipéptidos era necesaria para reparar el mucopéptido de la pared. No obstante, cuando se añadía la droga en presencia de aminoácidos, no se producía el efecto letal, lo cual indica que la síntesis proteica es requerida para varios procesos y no sólo para la síntesis de pared.

Hay que considerar también que la conversión de pre-replicador en replicador en el proceso de replicación cromosómica, requiere la síntesis de polipéptidos no dirigida por RNA (LARK, 1966). Es posible que la fase de expresión latente corresponda a un período en el que el DNA integrado se una a las estructuras periféricas logrando una estabilización de forma similar a lo que ocurre con el DNA cromosómico. Esta unión sería una condición necesaria para la replicación del DNA cromosómico y para la expresión del DNA transformante.

La transformación en B. subtilis ha permitido el mapeo de los distintos genes en el cromosoma de estos microorganismos. Mediante la recopilación y análisis de los resultados obtenidos empleando la transformación, YOUNG y WILSON (1972) han propuesto un mapa genético circular de B. subtilis que se recoge en la Fig. 9.

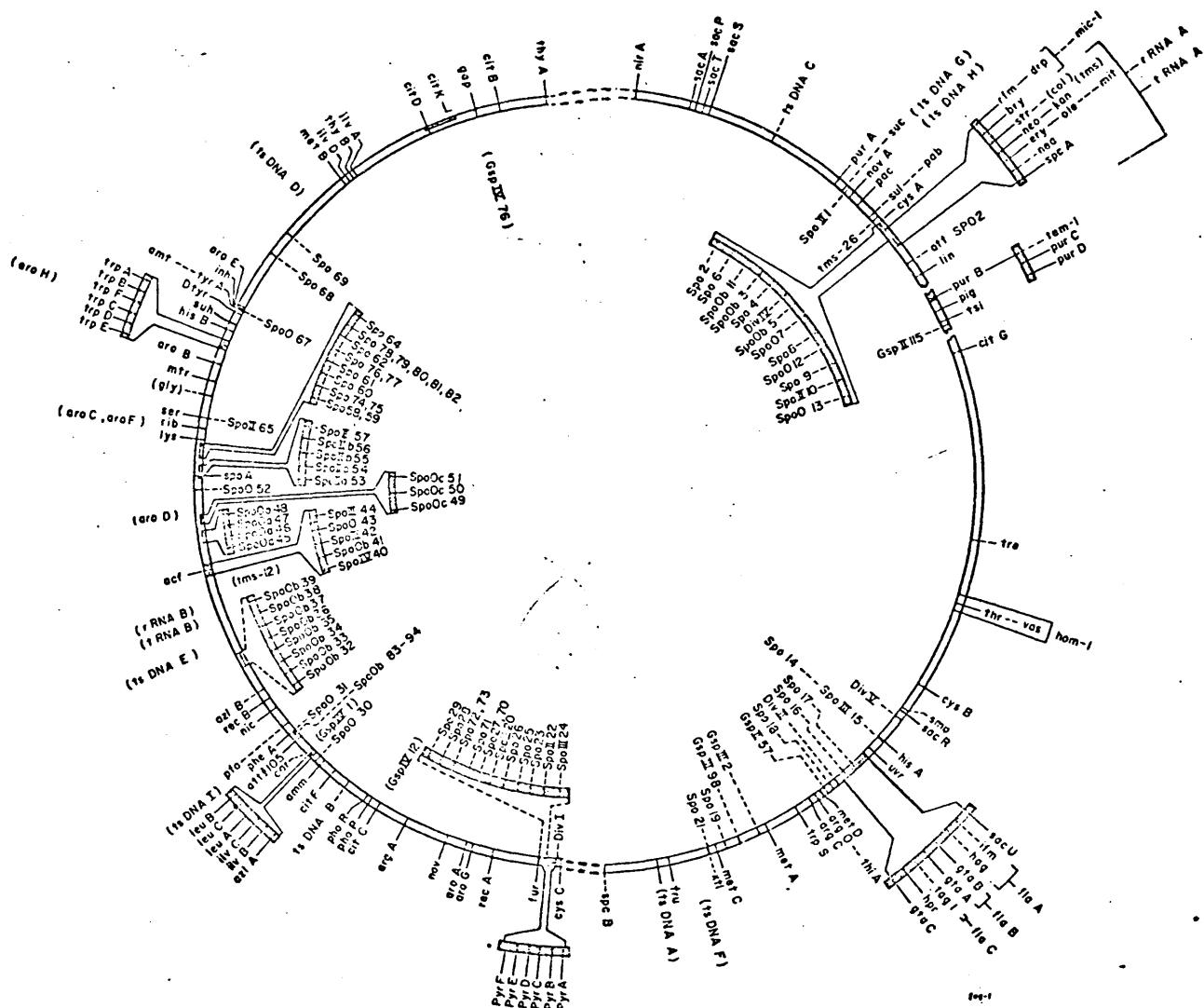


Fig. 9.- Mapa de ligamiento de *B. subtilis* (según YOUNG y WILSON 1972). Los loci morfogénéticos están colocados en el interior del círculo, mientras que los loci que no alteran directamente la morfología o el desarrollo están colocados en la parte exterior del círculo. Los loci señalados entre parentesis o con líneas discontinuas necesitan una confirmación experimental mayor de la que se posee actualmente.

V. TRANSFORMACION HETEROESPECIFICA Y TRANSFECCION

En algunas circunstancias se produce una transferencia de información genética de un DNA donador de una especie bacteriana o fágica a células competentes receptoras de otra especie bacteriana (RAVIN, 1961; JONES y SNEATH, 1970; SPIZIZEN y cols., 1966).

A.- TRANSFORMACIÓN HETEROESPECIFICA

La eficiencia de la transformación heteroespecífica es generalmente mucho más baja que la de la transformación homoespecífica, aunque DNAs de diferentes estirpes aislados de una misma especie pueden transformar a otra estirpe de la misma especie con eficiencias que difieren en más de dos órdenes de magnitud (SROGL, 1966). Marcadores que están ligados en las especies donadoras pueden llegar a estar no ligados temporal o permanentemente en un receptor heteroespecífico (BEATTIE y SETLOW, 1970; BISWAS y RAVIN, 1971).

Las diferencias cuantitativas entre las eficiencias de las transformaciones homo y heteroespecíficas dependen del

marcador genético empleado. Por ejemplo, en el sistema de B. subtilis, no hay transformación heteroespecífica o es relativamente baja para prototrofia a triptófano o metionina. Sin embargo, hay una eficiencia alta para la transmisión de resistencia a estreptomicina, eritromicina y otros antibióticos (DUBNAU y cols, 1965). Estos dos antibióticos son transferidos con eficiencia elevada entre especies de Haemophilus (NICKEL y GOODGAL, 1964) y entre pneumococos y estreptococos (RAVIN y De SA, 1964). La resistencia a estreptomicina se transfiere, mediante transformación, entre especies morfológicamente muy similares como son Neisseria catarrhalis y Moraxella nonliquefaciens (CATLIN, 1964) y entre S. sanguis, Staphilococcus y S. pneumoniae (DOBRZANSKI y cols, 1968; PAKULA, 1961).

En el sistema de E. coli ha sido observado que la resistencia a estreptomicina y eritromicina lleva implicada cambios en los ribosomas (OTAKA y cols, 1970). Por tanto, parece que los loci ribosomales en estirpes transformables son regiones conservadas en la evolución.

Estudios realizados con dos estirpes de B. subtilis y otras especies de Bacillus mostraron dos regiones conservativas con un gradiente de secuencias conservadas a ambos lados de estas regiones (CHILTON y MCCARTHY, 1969). Estudios paralelos de hibridación DNA-DNA y de temperaturas de fusión de heteroduplex, indican que, en Bacillus, la eficiencia de transformación entre estirpes y entre especies diferentes refleja relaciones de homología cuando se miden por estas técnicas fisicoquímicas.

Existen varias posibilidades para explicar el hecho de que las frecuencias de transformación heteroespecífica sean tan bajas:

a) El DNA no homólogo puede ser discriminado en el proceso de incorporación. Este hecho explicaría sólo una pequeña parte del decrecimiento de la eficiencia de este tipo de transformación, ya que en muchos sistemas heteroespecíficos los DNAs homólogos y heterólogos son incorporados con la misma eficiencia. Así por ejemplo, B. subtilis incorpora igualmente DNA homólogo y DNA de E. coli (JOENJE, 1975).

b) Después de la incorporación, el DNA es reconocido como heterólogo y es degradado por enzimas de restricción. Una endonucleasa de H. influenzae produce roturas bicatenarias en DNAs heterólogos, pero no en el DNA homólogo (SMITH y WILCOX, 1970). Un enzima similar de H. parainfluenzae degrada DNA extraño hasta tamaños pequeños y puede destruir la actividad transformante de DNAs de B. subtilis y H. influenzae (GROMKOVA y GOODGAL, 1972).

c) Otra posible explicación de la baja transformación heteroespecífica es la disminución de la integración provocada por las diferencias en la secuencia de bases entre el DNA transformante y el DNA receptor (RAVIN y CHEN, 1967).

RAVIN y MA (1972), en el sistema de S. sanguis, sometieron células competentes a un tratamiento con calor (48° C) antes de exponerlas al DNA transformante. Dichos autores observaron que este tratamiento producía una disminución de los niveles de transformación cuando se empleaba DNA homólogo, mientras que se producía un aumento de la transformación heteroespecífica.

Además, el calor provoca un decrecimiento de la competición en transformación con DNA heterólogo. Un efecto del calentamiento sobre las células competentes, provocando una disminución en la capacidad de incorporar el DNA, explicaría el decrecimiento en la transformación homoespecífica y en la competición, ya que las células tendrían menos lugares de incorporación por los que podrían competir los DNAs. Sin embargo, ello no explicaría el aumento en los niveles de transformación con DNA heterólogo. Por lo tanto estos autores postularon que el calentamiento del cultivo competente incrementa el reconocimiento de bases del DNA heteroespecífico y provoca un incremento de la integración.

Por otra parte, WILSON y YOUNG (1972), transformando B. subtilis con DNAs heterólogos, encontraron que la eficiencia de transformación para rifampicín-resistencia fue de 100 a 1000 veces mayor que para el prototrofismo. Cuando transformantes para marcadores heterólogos se utilizaron como fuente de DNA donador, se encontró que el fragmento de DNA heterólogo integrado (intergenote) fue capaz de transformar con la misma eficiencia que el DNA homólogo, y además, para rifampicín-resistencia, el DNA intergenótico transformó incluso con mayor eficiencia que el DNA homólogo. Por lo tanto, la hipótesis de disminución de la integración del DNA heteroespecífico no explica la existencia de DNA intergenótico de alta eficiencia de transformación (WILSON y YOUNG, 1972). Además, la cantidad de DNA integrado en la transformación heteroespecífica entre H. influenzae y H. parainfluenzae es mucho mayor que lo que cabría esperar de una eficiencia de transformación baja (BEATTIE y SETLOW, 1970). Por otra parte, el hecho de que el tratamiento con radiaciones ultravioleta provoque una mayor disminución de la integración del DNA de H. parainfluenzae, comparado con el homólogo, en las células de H. influenzae, sugiere que son necesarios trozos mayores de DNA heterólogo que de DNA homólogo para la integración (BEATTIE y SETLOW, 1970).

d) El DNA donador heterólogo puede poseer uno o más sitios específicos para los enzimas de restricción de la célula huésped. Después de la integración de dicho DNA, cuando el genoma huésped se replica, las regiones monocatenarias heteroespecíficas sufrirían el ataque de dichos enzimas. Sin embargo, después de habers realizado la transformación (en condiciones que permiten el crecimiento bacteriano) se detecta poca liberación del DNA de H. parainfluenzae integrado en H. influenzae (NOTANI y SETLOW, 1972) Estas observaciones sugieren que la posible acción de los enzimas de restricción sobre el DNA donador, antes o después de la integración, no es la única causa responsable de la baja transformación heteroespecífica.

e) El DNA de H. parainfluenzae puede ser letal para las células competentes de H. influenzae como consecuencia del proceso de integración. Este posible efecto letal podría ser debido al hecho de que el DNA de H. parainfluenzae induce a un fago defectivo de H. influenzae con mayor eficiencia que el DNA homólogo (SETLOW y cols. 1973). También fue observado por estos autores que una estirpe de H. influenzae sin fago defectivo inducible es inmune a la muerte provocada por DNA de H. parainfluenzae, aunque puede desarrollar una competencia elevada. Es poco probable que el efecto letal de la transformación entre especies de H. influenzae pueda explicar la baja eficiencia de transformación, ya que la estirpe que carece de profago defectivo inducible, y que no es convertida en inviable por DNA de H. parainfluenzae, es también transformada con baja eficiencia con dicho DNA.

f) El DNA donador heteroespecífico integrado, después de varios ciclos de replicación del DNA, puede no ser expresado en la célula. La expresión diferencial de marcadores podría explicar una disminución de los marcadores dependientes de la trans-

formación heteroespecífica. Varias observaciones apoyan esta hipótesis. DNA heteroespecífico ya integrado y reextraído a distintos tiempos durante la transformación entre H. influenzae y H. parainfluenzae produce un número mucho mayor de transformantes para los marcadores del DNA donador cuando se ensaya en la estirpe donadora que cuando se hace esta prueba en la especie receptora (NOTANI y SETLOW, 1972). La proporción entre tales transformaciones (especie donadora/especie receptora) disminuye muy gradualmente y después de dos horas de crecimiento del cultivo la razón llega a ser uno. Por otra parte, el DNA reextraído de colonias transformadas, transforman para el marcador donador original más eficientemente que el DNA donador heterólogo a la especie receptora original (BEATTIE y SETLOW, 1970). Estos datos sugieren que el DNA heteroespecífico integrado, que puede ser más efectivamente transcrito o traducido en la especie donadora original, tiene dificultad en la expresión génica cuando se encuentra en una especie receptora distinta de la donadora. Las colonias transformadas contienen células que ya han superado esta dificultad, probablemente porque han perdido algo de su material donador original que interfiere con la expresión. Un caso paralelo es el de mutante N19 de H. influenzae, en el cual dos marcadores ligados llegan a integrarse, pero se expresan diferencialmente, aunque el DNA integrado y reextraído de estas células transforma cepas salvajes para ambos marcadores con la misma eficiencia.

La fisiología de células transformadas heteroespecíficamente puede ser drásticamente alterada, ya que poseen una tasa de crecimiento disminuida. Esto es un fenómeno que puede reflejar alteraciones en la actividad de la RNA polimerasa (WILSON y YOUNG, 1972). Es posible que la mayor eficiencia de trans-

formación de DNA heterólogo respecto a DNA homólogo para ciertos marcadores (WILSON y YOUNG, 1972) pueda ser también un fenómeno de expresión, aunque la explicación dada era que los enzimas de restricción pueden, a veces, degradar el DNA homólogo, como se ha observado con preparaciones de enzimas de H. influenzae y H. parainfluenzae (GROMKOVA y GOODGAL, 1972). Sin embargo, tal degradación del DNA homólogo puede ser debida a nucleasas no específicas.

Estas observaciones sugieren que la expresión de un gen particular, después de la integración, puede depender no sólo del gen en sí mismo, sino también de la maquinaria de transcripción y traducción de la célula. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la mutación espontánea para la resistencia a estreptomicina, que se produce en E. coli y que afecta la estructura de los ribosomas, puede provocar una supresión selectiva de la actividad de genes no relacionados.

B. TRANSFECCION

Este término es un neologismo introducido por FÖLDES y TRAUTNER (1964) para indicar un fenómeno que reúne características comunes a la transformación y a la infección por bacteriófagos, designando el proceso de infección de una célula por ácido nucleico aislado de un virus, y que da como resultado la producción de partículas completas de bacteriófagos. La transfección bacteriana comparte con la transformación los requerimientos para la incorporación de ácidos nucleicos en las células competentes y la expresión de la información genética contenida en dichas moléculas. La mayor diferencia existente entre los dos procesos es que la transformación requiere la integración del DNA exógeno en el cromosoma bacteriano, mientras que la

transfección usualmente no la requiere. En el sistema de B. subtilis, se sabe que es necesaria la recombinación entre moléculas del DNA transfectante para que se produzca el fenómeno de transfección. Este tipo de recombinación ha sido denominada recombinación primaria (SPATZ y TRAUTNER, 1971). Se considera que la recombinación primaria es necesaria para restablecer un replicón del bacteriófago intacto a partir de los genomas inactivados del virus (Fig. 10).

En el sistema de B. subtilis se ha estudiado la relación existente entre la concentración del DNA aislado de bacteriófagos y la formación de centros infectivos, habiéndose comprobado que la naturaleza de las curvas de respuesta a la dosis depende de la fuente del DNA transfectante. Curvas de respuesta de primer orden han sido obtenidas empleando DNA de los fagos Ø 29 y Ø 105, mientras que el DNA de los fagos SPP1, SP50 y SP82 dan respuestas de segundo, tercero y tercero o cuarto orden respectivamente (TRAUTNER y SPATZ, 1973). Las curvas de respuesta a la dosis corresponden el número de moléculas infectivas que cooperan en la producción de un centro infectivo (SPATZ y TRAUTNER, 1971; GREEN y URBAN, 1972). La naturaleza de la colaboración consiste en una recombinación entre las moléculas infecciosas del DNA fágico. Recientemente, ha sido observado por HIROKAWA y cols. (1977) que en la transfección del fago Ø 29 es necesaria más de una molécula de DNA para producir un centro infectivo. Este resultado podría estar en controversia con el hecho de que este fago presenta una respuesta lineal a la dosis de DNA empleada. No obstante dichos autores han comprobado que la mayoría de las moléculas transfectantes del DNA de Ø 29 están combinadas, formando agregados de muchas moléculas. Por lo tanto, estos autores postulan que el requerimiento multimolecular del DNA fágico puede ser satisfecho por

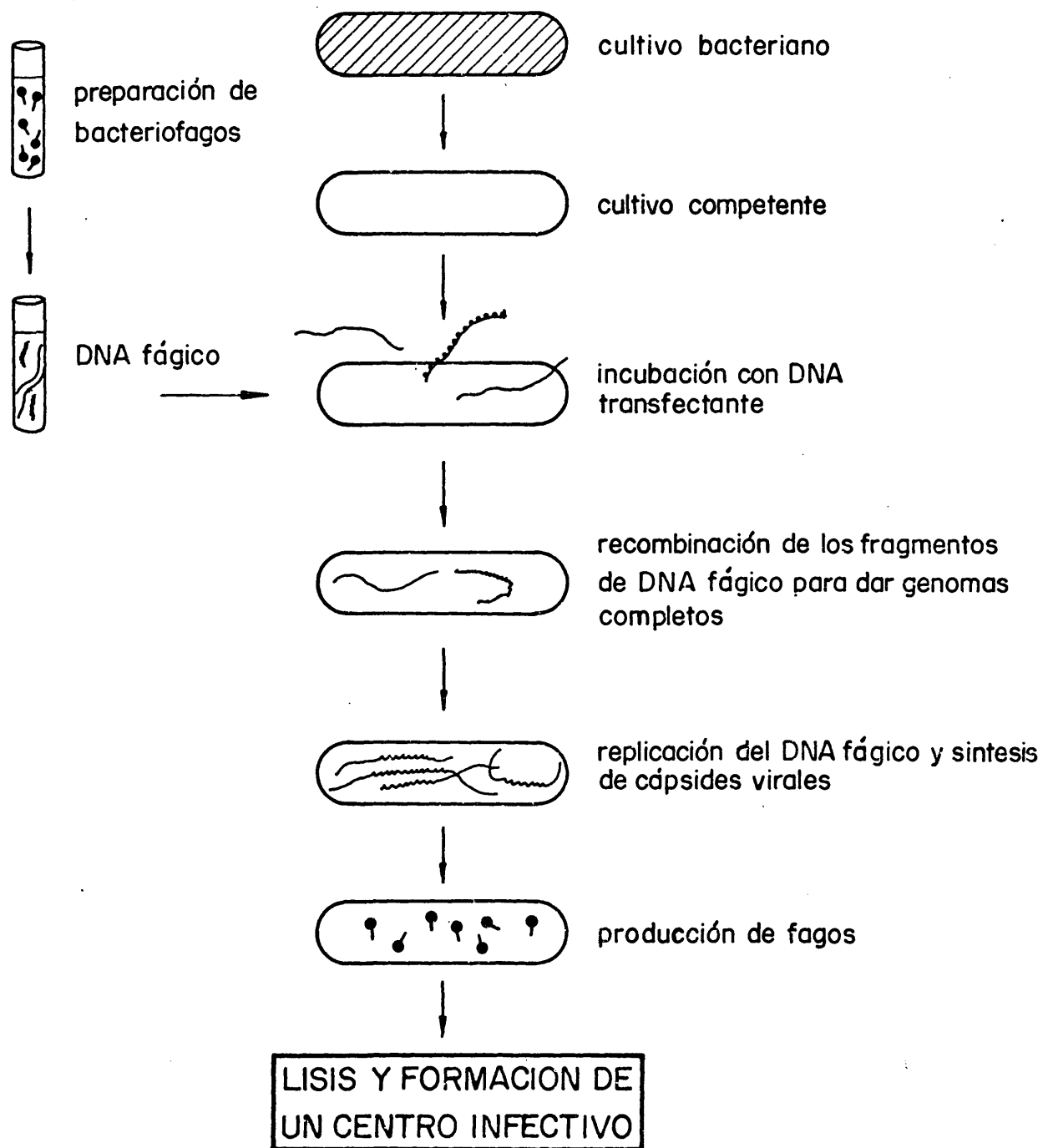


Fig. 10.- Representación esquemática del proceso de transfección

la incorporación de alguno de estos agregados, que producirían una curva lineal de respuesta a la dosis. Con esta interpretación, la distinción entre fagos de B. subtilis que muestran una respuesta lineal o una respuesta múltiple, residiría en las diferentes configuraciones del DNA transfectante más que en diferentes mecanismos de incorporación y procesamiento del DNA. En efecto, el hecho de que la fracción minoritaria del DNA biológicamente activa (que sedimenta en la posición de DNA monomérico) muestre una respuesta de dos, parece reflejar un mecanismo de transfección general como el sugerido por DISHMAN (1972). Una respuesta de dos, como mínimo, debería esperarse, si en el curso de la incorporación algunas moléculas de DNA bicatenario son convertidas en monocatenarias por la pérdida de una de sus cadenas. La cadena monocatenaria que ha entrado en la célula debe unirse con su cadena complementaria, procedente de otra molécula, para iniciar la replicación. Esta interacción conduciría a encontrar niveles mayores de recombinación en transfecciones cruzadas que las obtenidas empleando cruces equivalentes de fagos (SPATZ y TRAUTNER, 1971). Este hecho ha sido observado también en el caso de transfección con otros fagos como SPO2 (JÜRGENS, citado por TRAUTNER y SPATZ, 1973), el cual da una respuesta de primer orden.

La estricta correlación entre la sensibilidad de la transfección a la acción de las proteasas, la respuesta lineal y la capacidad del fago para transfectar a una estirpe deficiente en el proceso de recombinación (SPATZ y TRAUTNER, 1971) podría sugerir que los DNAs fágicos con estas características en la transfección forman agregados unidos por proteínas. Además, la proteína asociada al DNA es requerida para la transfección con formas monoméricas de dicho DNA. Ya que en esta tesis expe-

rimental no se han realizado estudios sobre el proceso de transfección, no comentaremos con más detalle sus características, pudiendo encontrarse más información en las revisiones de TRAUTNER y SPATZ (1973) y NOTANI y SETLOW (1974).

VI. MECANISMOS DE INCORPORACION DEL DNA TRANSFORMANTE

Una vez establecidas las distintas etapas del proceso transformante, pasaremos a realizar un estudio detallado de las primeras fases de dicho proceso, puesto que nuestro interés experimental se ha centrado precisamente en estas etapas. En este capítulo, estableceremos las características de los receptores específicos del DNA presentes en las células competentes, así como la función de las autolisinas y de las actividades nucleásicas de las células receptoras, en cuanto que están implicadas en la transformación.

A.- UNION DEL DNA A LAS CELULAS COMPETENTES

La adsorción del DNA exógeno a la superficie de las células competentes requiere la presencia de componentes de la superficie celular capaces de capturar las moléculas de DNA del medio.

1. Receptores

Las estructuras celulares que interaccionan con el DNA transformante reciben el nombre de receptores del DNA y se encuentran situados en la membrana plasmática.

Medidas cinéticas de la interacción entre DNA y las células competentes han permitido calcular el número aproximado de receptores por célula. En el sistema de S. pneumoniae se calculan de 30 a 80 receptores por célula (FOX y HOTCHKISS, 1957) y en el de H. influenzae alrededor de dos receptores por célula (STUY y STERN, 1964). Fotografías realizadas al microscopio electrónico por STACHURA y cols. (1968) de células competentes de H. influenzae mostraron una media de 8 moléculas de DNA unido por célula, sugiriendo este hecho la presencia de un mínimo de 8 receptores por célula.

El número de receptores en el sistema de B. subtilis ha sido estimado de 20 a 50 (SINGH, 1972). Estos datos eran determinados calculando la fracción de células competentes en la población mediante el empleo de la técnica de marcadores no ligados. Dicha técnica no es muy exacta y puede dar lugar a cálculos erróneos. Sin embargo los datos indican que, tanto en el sistema de B. subtilis como en el de S. pneumoniae, las células competentes contienen más receptores que las de H. influenzae. Además, existen evidencias genéticas de que una molécula de DNA puede interaccionar con dos células de B. subtilis al mismo tiempo (KELLY, 1967).

En el sistema de S. pneumoniae han sido realizados numerosos estudios que han permitido establecer la naturaleza bioquímica de sus receptores y su localización.

Como ya hemos dicho previamente, en el sistema de S. pneumoniae, es necesaria la presencia de colina en el ácido teicoico (componente de la pared celular) para que las células sean capaces de unir DNA. Si dicho compuesto es sustituido por un análogo estructural (etanolamina) las células no pueden ser transformadas.

BRILES y TOMASZ (1970) y TOMASZ y cols. (1971) realizaron experiencias de incorporación de colina radioactiva en paredes que contenían etanolamina. Mediante técnicas autorradiográficas dichos autores comprobaron que las nuevas moléculas de colina se incorporaban en la región ecuatorial de la bacteria (zona de crecimiento). A la vista de estos resultados y realizando experiencias con pulsos cortos de colina se ha llegado a la conclusión de que es necesaria la presencia de este compuesto en la zona ecuatorial, ya que en este lugar se produce la unión del DNA exógeno.

ESPINOSA (1975) observó que al tratar cultivos de B. subtilis con cloramfenicol durante el desarrollo de la competencia, se producía una disminución en la capacidad de unión de dichas células, lo cual parecía indicar que la sustancia implicada en la unión del DNA era una o más proteínas presentes en la membrana celular.

En el sistema de S. pneumoniae, al menos la mitad de las moléculas de DNA adsorbidas por las células competentes se encuentran unidas a los receptores presentes en la membrana plasmática (SETO y cols, 1975). Dichos receptores son comunes para los procesos de transformación y transfección, ya que el DNA fágico desplaza al DNA bacteriano en experiencias de compe-

tición (LOPEZ, comunicación personal). SETO y TOMASZ (1975 b) han aislado un "factor de unión a DNA" de la superficie de células competentes de S. pneumoniae. Parece que este componente que une DNA está relacionado con los receptores del DNA presentes en las superficies de los cultivos competentes. Esta hipótesis está basada en dos observaciones: (1) los tratamientos que causan la solubilización del factor de unión también causan una inactivación paralela de la capacidad de unión del DNA de las células tratadas (2) tan sólo los cultivos competentes de S. pneumoniae son capaces de producir factor de unión.

Este factor soluble es sensible al calor, a los enzimas proteolíticos, a sales y al formaldehído y, además, es capaz de unir DNA nativo y monocatenario. Los receptores específicos del DNA serían, así, proteínas situadas en la membrana plasmática separada del exterior por la pared celular.

SETO y cols. (1975) han postulado que tanto las células competentes como las no competentes (a las que no se ha añadido activador) poseen numerosos receptores específicos para el DNA que pueden ser desenmascarados por disrupción mecánica de la pared o por baja concentración iónica. Según dichos autores el desenmascaramiento de los receptores de la membrana plasmática es parte del fenómeno de desarrollo de la competencia inducido por el activador (factor de competencia).

En el sistema de S. sanguis RANHAND (1974) ha demostrado la presencia de aminoácidos en los receptores, pareciendo este hecho indicar que son proteínas.

2. Autolisinas

Las células de S. pneumoniae que poseen etanolamina en su pared (células EA) no son capaces de unir DNA transformante (TOMASZ y WESTPHAL, 1971). Dichas bacterias poseen un enzima autolítico anómalo (forma E), mientras que las células competentes con colina en el ácido teicoico del péptidoglicano de pared poseen un enzima autolítico activo (forma C). Las células EA de S.pneumoniae presentan paredes resistentes a la acción de autolisina exógena, además de haber perdido el enzima autolítico activo, característico de las células con colina, el cual es reemplazado por un enzima de bajo peso molecular y baja actividad catalítica (forma E). La forma E de la autolisina puede ser convertida in vitro en forma C mediante una breve incubación con paredes celulares que contienen colina, a baja temperatura (TOMASZ y WESTPHAL, 1971). Un fenómeno similar ha sido observado in vivo por TOMASZ y cols (1975). Debido a estos hechos, ha sido sugerido que la forma E puede representar un precursor biosintético inactivo, pero normal, del enzima autolítico. La activación de este preenzima puede ocurrir en un estado post-ribosomal (en la superficie celular, via interacción con ácidos teicoicos que contienen colina).

HOLTJE y TOMASZ (1976) han logrado purificar la forma E de la autolisina, demostrando que la conversión de la forma inactiva en la forma activa puede ser reproducida con la forma E homogénea de la amidasas y empleando paredes purificadas. Esto indica que no es necesaria la presencia de cofactores en este interesante proceso.

Los resultados de los estudios con el sistema de pneumococos indican claramente que los ácidos teicoicos de las paredes que contienen colina son capaces de inducir en el enzima autolítico algún cambio estructural o conformacional, que es esencial para la actividad catalítica. Además, el atrapamiento del enzima por el ácido teicoico puede contribuir a algunas propiedades de la autolisina, tales como su peso molecular y su estabilidad.

Por otra parte, la adición de un crudo de autolisina, procedente de cultivos con colina, a células EA provocaba una reversión en los efectos producidos por la presencia de etanolamina. Esta técnica ha sido denominada "curado fenotípico". Las células "curadas" por este procedimiento son capaces de unir DNA exógeno.

Una explicación al papel activo representado por la colina en el fenómeno de adquisición de la competencia se hallaría en las experiencias de SETO y TOMASZ (1975 b). Estos autores han detectado, en los sobrenadantes de células competentes, sustancias de localización exclusivamente intracelular, entre ellas autolisina, la cual se halla a concentraciones capaces de inducir, bajo condiciones adecuadas, la formación espontánea de protoplastos. Estos resultados han sido interpretados considerando que el activador aceleraría el proceso de transporte de moléculas de autolisina hacia el espacio periplásmico. Posteriormente dicha autolisina provocaría una lisis parcial de la pared, localizada exclusivamente en la zona ecuatorial, siempre que la colina se encuentre como componente del ácido teicoico. En estas condiciones, quedarían al descubierto los receptores de la membrana, haciéndolos así accesibles al

DNA transformante. Es decir, que el estado de competencia sería el reflejo de una inestabilización temporal de la membrana debida al factor de competencia.

En el sistema de B. subtilis, YOUNG y SPIZIZEN (1963) observaron que las células competentes poseían mayor actividad autolítica que las células no competentes. Dicho enzima autolítico es una acetil-muramil-L-alanina-amidasa que produce la liberación de alanina. Estos hechos hicieron postular a YOUNG y cols. (1964) la hipótesis de que la separación de los polisacáridos de los péptidos de la pared, producida por la autolisina, podría conducir a una relajación en la estructura del mucopéptido, lo que permitiría la aparición de "agujeros" en la pared celular, a través de los cuales las moléculas de DNA podrían pasar durante el proceso de transformación.

Por otra parte, el "factor de competencia" de naturaleza proteica detectado por AKRIGG y AYAD (1970) en el sistema de B. subtilis poseía una actividad lítica.

Los hechos descritos previamente podrían indicar que, en el sistema de B. subtilis, la autolisina podría desempeñar, en la transformación, un papel similar al ya descrito en el sistema de S. pneumoniae pero, hasta el momento, este hecho no ha podido ser comprobado.

RANHAND (1973) ha comprobado, en el sistema de S. sanguis, que el factor de competencia adicionado a un cultivo celular provoca la síntesis de una nueva proteína y de un enzima lítico que posee actividad autolítica y actividad lítica frente a células no competentes. Los resultados presentados por este

autor muestran que, en los estreptococos del grupo H, la competencia está asociada o es iniciada por una autólisis. Los cambios estructurales producidos por la autolisina deben tener lugar en el punto de crecimiento de la pared celular, ya que allí es donde parece que las células están más afectadas (RANHAND y cols, 1971). Estos resultados coinciden con los obtenidos por TOMASZ y cols. (1971) en el sistema de S. pneumoniae y parecen indicar un comportamiento similar de las autolisinas en los dos sistemas.

3. Interacción entre DNA y superficie celular

En el sistema de S. pneumoniae, SETO y TOMASZ (1974) han establecido los distintos pasos sucesivos implicados en la adsorción del DNA transformante. Estos autores han empleado, en sus experiencias, etiléndiamonotetraacetato sódico (EDTA) que es un agente quelante de los cationes divalentes del medio. El EDTA presenta la propiedad de aumentar la capacidad de unión de DNA por las células competentes de pneumococos, mientras que la incorporación de DNA y la aparición de transformantes es fuertemente inhibida. Basándose en sus resultados han postulado un modelo (Fig. 11) que contempla las etapas desde que aparece en el medio el factor de competencia hasta que el DNA se encuentra irreversiblemente unido a las células competentes. En el primer paso de este proceso (1) el activador atraviesa la pared celular yendo a unirse en la membrana a su receptor específico. Si se adiciona tripsina al medio, dicha unión no se produce debido a la destrucción del activador, mientras que si se emplean en estas experiencias mutantes resistentes a tripsina esta circunstancia no se produce. (2) La unión activador-receptor del activador se ha producido. (3) Se produce la síntesis de proteínas (β -ga-

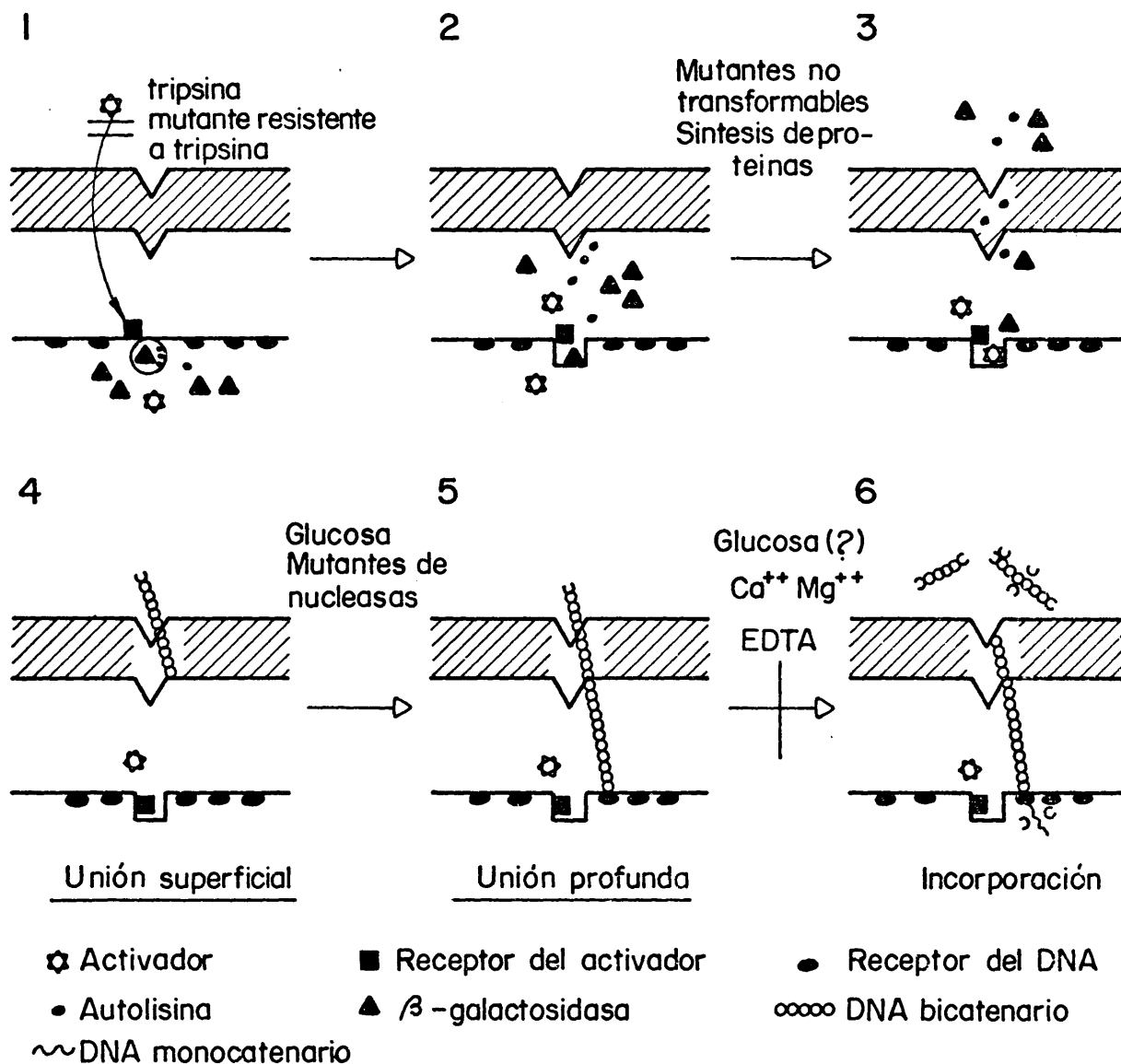


Fig. 11.- Esquema de las primeras etapas de unión e incorporación de DNA a pneumococos (según LOPEZ, 1974). (ver texto).

lactosidasa, autolisina, etc) que son liberadas al medio. El paso de (2) a (3) aparece bloqueado en los mutantes no transformables. (4) El DNA exógeno se une a la superficie celular mediante un proceso que no requiere energía, denominado unión superficial. (5) El DNA se une a sus receptores específicos situados en la membrana celular constituyendo la unión profunda de dicho DNA. Esta etapa requiere energía y por tanto el paso de (4) a (5) puede ser inhibido por la ausencia de glucosa. (6) Finalmente se produce la incorporación del DNA, lo que requiere cationes y energía. Consecuentemente el EDTA es capaz de bloquear el paso de (5) a (6).

B.- PENETRACION DEL DNA EN EL INTERIOR DE LAS CELULAS RECEPTORAS

El DNA unido reversiblemente a la membrana plasmática de las células competentes es incorporado por dichas células mediante un proceso que requiere energía. Al finalizar este proceso el DNA se encuentra en una forma inaccesible a la acción de la DNasa exógena.

1. Acción de las nucleasas en la penetración

El estado competente se caracteriza no sólo por la capacidad de incorporar DNA exógeno, sino también por la capacidad de degradar DNA externo (LACKS y GREENBERG, 1973).

En el sistema de S. pneumoniae se ha caracterizado una endonucleasa mayoritaria, que corresponde, aproximadamente, al 80% de la actividad desoxirribonucleásica de la célula (LACKS, 1970). Su localización en la membrana celular (LACKS y NEUBERGER, 1975) parece indicar que juega algún papel en la incorporación de DNA.

La actividad de este enzima es inhibida por RNA (LACKS y cols., 1975). Este hecho puede concordar con la observación de KOHOUTOVA (1967) acerca de la inhibición de la transformación con RNA. Este enzima requiere in vitro iones magnesio o manganeso (LACKS y cols. 1975) y actúa endonucleolíticamente, produciendo oligonucleótidos (LACKS y GREENBERG, 1967).

Varios aspectos de la incorporación del DNA reflejan propiedades de la endonucleasa mayoritaria de las células de S. pneumoniae e indican una participación del enzima en dicho proceso:

(1) MORRISON y GUILD (1973) comprobaron que la cantidad de oligonucleótidos formados fuera de la célula es aproximadamente igual a las moléculas de DNA que han penetrado en la célula competente.

(2) La incorporación de DNA requiere cationes divalentes. El magnesio es esencial para la incorporación del DNA (LACKS y GREENBERG, 1973). El calcio estimula la transformación, sobre todo empleando concentraciones limitantes de magnesio pero, incluso en estas condiciones, el calcio sólo permite la producción del 1% de transformantes obtenidos en presencia de magnesio (LACKS, 1977). Por otra parte, el calcio produce un aumento de la incorporación del DNA correlacionado con el incremento de fragmentos ácido-solubles del DNA donador en el medio.

SETO y TOMASZ (1976) demostraron que el calcio es un requerimiento absoluto para la penetración del DNA exógeno. Estos autores resuspendieron, en un medio con tampón Tris, cé-

lulas que habían estado creciendo en un medio que contenía fosfatos, magnesio y calcio. En estas condiciones, observaron poca estimulación de la incorporación del DNA cuando se añadía magnesio al medio tamponado con tris.

Los resultados descritos podrían parecer contradictorios. Sin embargo, LACKS (1977) ha postulado una hipótesis, que podría armonizar estos hechos. Este autor supone que las células lavadas con fosfato retendrían preferencialmente calcio, mientras que las células resuspendidas en tampón tris retendrían magnesio. Las bases físicas de este efecto podrían ser debidas a una retención preferencial de cationes en la superficie celular, dependiendo del tampón o, quizás, a una distinta persistencia en el medio de crecimiento de los microcristales de fosfatos magnésico y cálcico formados. Estos problemas podrían ser eliminados lavando las células en un medio tamponado con tris que contenga EDTA o utilizando un medio de crecimiento sin cationes. LACKS (1977), empleando estas condiciones, observó un requerimiento absoluto de magnesio, calcio y también de potasio para la incorporación del DNA exógeno. Las funciones del calcio y del potasio son desconocidas, pero el magnesio podría ser requerido para la actividad de la endonucleasa mayoritaria.

El DNA unido a la superficie celular es bicatenario, mientras que el DNA que ha penetrado en la célula es monocatenario. Esta conversión podría ser realizada por la endonucleasa mayoritaria, degradando una cadena del DNA y facilitando la incorporación de la otra cadena.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se han empleado mutantes deficientes en la endonucleasa mayoritaria.

Existen tres tipos de tales mutantes:

a) Mutantes end que poseen una actividad enzimática residual apreciable. Estos mutantes incorporan DNA y se transforman con la misma eficiencia que la estirpe salvaje. Este grupo posee una mutación simple, la cual parece estar situada en el gen estructural del enzima (LACKS, 1970).

b) Mutantes noz, que poseen una mutación secundaria en el mismo gen que contiene la end. Dicha mutación provoca una reducción mayor en los niveles residuales de la actividad endonucleolítica (LACKS y cols.1975).

c) Una clase intermedia contiene mutantes end y noz. Estos mutantes no muestran ninguna actividad enzimática detectable in vitro, pero dan niveles intermedios de transformabilidad, permitiendo cierto grado de penetración del DNA, aunque la mayor parte de éste permanece unido a la superficie. Este hecho parece indicar que las cepas del tipo salvaje contienen un exceso del enzima y que sólo en mutantes con gran deficiencia enzimática es posible detectar una inhibición de los niveles de transformación.

Los mutantes con mayor deficiencia en la endonucleasa mayoritaria se transforman a un nivel de sólo 10^{-3} comparado con la cepa salvaje. Estos mutantes son capaces de unir DNA y deben tener bloqueada la etapa de incorporación.

LACKS y GREENBERG (1976), empleando mutantes deficientes en la actividad nucleásica, observaron que el DNA unido a dichos mutantes presentaba roturas monocatenarias. Dichas roturas aparecen distribuidas al azar en ambas cadenas del DNA y están separadas por unos 6000 nucleótidos. Este tipo de rupturas aparecían en presencia de EDTA en el medio.

LACKS (1977), empleando mutantes del tipo (c), en ausencia de EDTA observó la aparición de roturas bicatenarias y mayor número de roturas monocatenarias que en las experiencias previas (LACKS y GREENBERG, 1976).

MORRISON y GUILD (1973) detectaron roturas bicatenarias en el DNA expuesto a células competentes de pneumococos (tipo salvaje) poco antes de producirse el proceso de incorporación.

LACKS (1977) propone que dichas roturas bicatenarias se producirían en el momento de iniciarse la incorporación, efectuándose en ausencia de la endonucleasa mayoritaria. Dicha nucleasa actuaría en los lugares en los que se han producido las roturas, permitiendo la incorporación del DNA exógeno. Las roturas previas serían producidas por un enzima diferente durante el proceso de unión del DNA. El DNA se uniría a las células por los lugares de ruptura. Posiblemente un componente de la superficie celular se uniría al extremo de la cadena originado por la ruptura.

En el sistema de B. subtilis han sido detectados fragmentos bicatenarios de DNA que son convertidos en monocatenarios durante el proceso de incorporación (PIECHOWSKA y FOX, 1971; DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1973 a, 1973 b).

Por otra parte, poco después de la incorporación del DNA donador por las células competentes, DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU (1973 b) y JOENJE y VENEMA (1975) han detectado rupturas bicatenarias del DNA. Se sabe poco acerca de las bases enzimáticas de esta fragmentación, pero SCHER y DUBNAU (1973 y 1976) han aislado y caracterizado una endonucleasa localizada en la superficie celular. Dicho enzima podría estar implicado en el proceso, ya que produce fragmentos del DNA donador de tamaño similar a las moléculas bicatenarias producidas por células competentes (HASELTINE y FOX, 1971; DUBNAU y CIRIGLIANO, 1972 y JOENJE y VENEMA, 1975).

Recientemente, BURKE y SPIZIZEN (1977) han presentado evidencias de que la endonucleasa dependiente del magnesio, que se activa con el calor, observada por McCARTHY y NESTER, (1969) puede estar implicada en la producción de fragmentos bicatenarios en la transformación.

En el sistema de B. subtilis, las células no competentes pueden producir fragmentos bicatenarios. Aunque las células no competentes no unen DNA, son capaces de presentar interacciones transitorias con el DNA transformante (HASELTINE y FOX, 1971; JOENJE y VENEMA, 1975).

En el mismo sistema empleando las condiciones usuales para realizar el proceso de transformación, fragmentos bicatenarios de DNA son convertidos en segmentos monocatenarios (PIECHOWSKA y FOX, 1971; DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU, 1973 a) y en productos ácido-solubles (DUBNAU y CIRIGLIANO, 1972 y JOENJE y VENEMA, 1975).

Por otra parte, los productos ácido-solubles detectados por JOENJE y VENEMA (1975) eran sólo producidos por las células competentes y estaban formados en un 60% por mononucleó-

tidos. Este hecho indica que tales productos son probablemente generados por una actividad exonucleolítica.

Como ya hemos dicho previamente, tanto las células competentes como las no competentes, en B. subtilis, dan origen a una fragmentación bicatenaria del DNA. Las células no competentes dan lugar a una mayor pérdida de la actividad biológica del DNA exógeno expuesto a ellas. HASELTINE y FOX (1971) han mostrado que las células no competentes provocan una disminución del peso molecular del DNA donador y, además, producen una inactivación del DNA por otro mecanismo desconocido, ya que la pérdida de actividad biológica no puede ser explicada sólo por la disminución de su peso molecular.

En cultivos competentes de B. subtilis, JOENJE y VENEMA (1975) detectaron productos ácido-solubles asociados a las células, principalmente monómeros (ácido timidílico) y sólo una pequeña fracción (2%) de oligómeros. Sin embargo, en los sobrenadantes de las células que habían sido expuestas al DNA, estos autores encuentran una fracción considerable de oligómeros, aunque también aparecían monómeros constituidos por timina. Una posible explicación de la distinta composición de los productos ácido-solubles presentes en los sobrenadantes y los asociados a las células, podría ser una liberación preferencial de oligómeros y timina comparada con la liberación de ácido timidílico. Sin embargo, no se puede excluir que los productos ácido-solubles asociados a las células y liberados al medio sean producidos por diversos sistemas de nucleasas generadores de distintos productos.

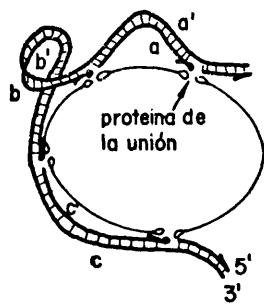
Por otra parte, las proteínas básicas (lisozima, citocromo C, protamina y espermina) inhiben la ruptura exonucleolítica producida por células competentes (JOENJE y VENEMA, 1975). Un efecto similar de estas proteínas ha sido observado por DAVIDOFF-ABELSON y DUBNAU (1973 a). Estos autores comprobaron que sólo se podían aislar fragmentos monocatenarios de alto peso molecular cuando las células se lisaban en un medio que contenía concentraciones elevadas de una de estas proteínas básicas, las cuales protegen al DNA contra la acción de las nucleasas.

JOENJE y VENEMA (1975) convirtieron células competentes en protoplastos, observando que la mayor parte de la actividad exonucleolítica era liberada al medio. Este hecho parece indicar que el enzima está localizado fuera de la membrana citoplásmica o muy próximo a ella. Es posible que la exonucleasa esté asociada con los mesosomas, que son liberados durante el proceso de obtención de protoplastos (FITZ-JAMES, 1964).

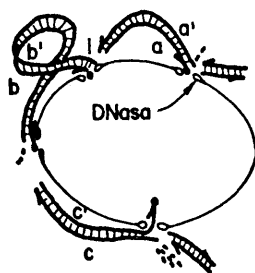
2. Modelos de unión y penetración

Todos los datos recopilados hasta el momento actual han permitido establecer un modelo para la unión e incorporación del DNA exógeno en el sistema de S. pneumoniae y que posiblemente corresponda también a dichas etapas de la transformación bacteriana en B. subtilis (Fig. 12).

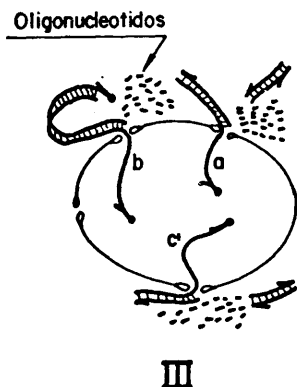
LACKS y GREENBERG (1976) suponen que el DNA se une a una proteína presente en la superficie celular (quizás covalentemente), la cual provoca rupturas en el DNA, en una reacción que requiere energía. Una nucleasa (en el sistema de



I.- Formación de rupturas monocatenarias al tiempo que el DNA se asocia a la proteína de la unión



II.- Formación de rupturas bicatenarias durante la iniciación de la entrada del DNA.



III.- El DNA penetra en una reacción catalizada por una nucleasa asociada a la membrana que degrada una cadena del DNA a oligonucleótidos, al tiempo que el segmento de cadena complementaria penetra en la célula

Fig. 12.- Modelo molecular de la unión e incorporación del DNA en S. pneumoniae (según LACKS y GREENBERG, 1976)

S. pneumoniae, la endonucleasa mayoritaria) iniciaría la incorporación del DNA, produciendo rupturas en la cadena del DNA opuesta a la ya previamente rota. La cadena unida a la proteína específica de la unión podría penetrar en el interior de la célula (quizás dicha proteína podría conducir el DNA a través de la membrana), mientras que la misma nucleasa podría digerir progresivamente la cadena complementaria, uniéndose secuencialmente a ella y liberando oligonucleótidos que permanecen fuera de la célula.

La penetración de la cadena unida inicialmente a la célula sería facilitada por la hidrólisis secuencial de la otra cadena. Este proceso de incorporación requiere iones potasio, calcio y magnesio.

Por este mecanismo, segmentos monocatenarios de ambas cadenas de las moléculas de DNA unido pueden penetrar en la célula y pueden integrarse en el genoma de la célula receptora.

VII. INTERACCIONES ENTRE DNA Y ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS

Una vez establecidas las características de las primeras etapas del proceso transformante, pasaremos a estudiar las asociaciones establecidas entre el DNA y las membranas celulares. Señalaremos las asociaciones existentes con DNA homólogo y DNAs heterólogos tanto en sistemas in vivo como en sistemas in vitro.

A.- ASOCIACION ENTRE DNA Y MEMBRANA IN VIVO

Como ya hemos dicho en el capítulo previo, los receptores específicos para el DNA presentes en las células competentes, parecen estar situados en la membrana citoplásmica de dichas células.

SETO y cols. (1975) realizaron experiencias de unión de DNA exógeno a protoplastos (células que han perdido su pared por tratamiento con autolisinas) procedentes de células competentes de S. pneumoniae. Dichos autores comprobaron que la can-

tividad de DNA unido por los protoplastos era muy pequeña si se comparaba con las moléculas unidas por las células en las mismas condiciones . Además, el pH y la temperatura óptima para la unión a estas fracciones subcelulares eran completamente distintos de los óptimos correspondientes a células vivas, y los bajos niveles de unión de DNA a protoplastos no eran afectados por inhibidores de la unión a células.

Estos hechos parecen indicar que los protoplastos obtenidos de cultivos competentes de pneumococos no poseen los receptores específicos del DNA que son detectados en células intactas mediante la transformación genética. Sin embargo, SETO y cols. (1975), observaron que células intactas colocadas en un medio hipertónico perdían un 35% de su capacidad de unir DNA. Estos autores postulan que puede producirse una inactivación de los receptores o una liberación de éstos durante el proceso de eliminación de la pared, ya que las condiciones hipertónicas, utilizadas en la obtención de protoplastos, provocan en las células una disminución en la cantidad de DNA unido.

En B. subtilis, RYTER y LANDMAN (1964) habían observado que las condiciones hipertónicas pueden causar daños estructurales. Por otra parte, estas condiciones también dan lugar a la pérdida de constituyentes celulares periplásmicos, en el sistema de B. subtilis (PIECHOWSKA y FOX, 1971). Estos dos hechos muestran que las hipótesis de SETO y cols. (1975) podrían ser válidas, ya que efectos parecidos provocados por las condiciones hipertónicas han sido detectados en otro sistema bacteriano.

Con el fin de dilucidar cual de estas dos hipótesis era correcta, SETO y cols. (1975) realizaron una serie de expe-

riencias de unión de DNA exógeno a células competentes en presencia de EDTA (para evitar la penetración del DNA en el interior de la célula). Una vez producida la unión, las células eran tratadas con autolisina para convertirlas en protoplastos. La cantidad de DNA que permanecía unido a estos protoplastos correspondía al 40% de la unión detectada en células. Estos niveles de unión a protoplastos son significativos sólo si se realiza la experiencia en presencia de una fuente de energía, es decir si se produce una "unión profunda" previa entre el DNA y la célula receptora.

Por otra parte, SETO y TOMASZ (1975 b) detectaron un factor capaz de unir DNA en los sobrenadantes de células que habían sido tratadas con autolisina (conversión en protoplastos). Estos autores suponen que dicho factor está relacionado con los receptores del DNA.

Los hechos previamente descritos parecen indicar que los receptores serían liberados al medio durante el proceso de obtención de protoplastos y ésta sería la causa de la baja capacidad de unión de DNA por dichas estructuras.

MILLER y cols. (1972), en el sistema de B. subtilis, comprobaron que los protoplastos obtenidos de células competentes no pueden ser transformados por DNA exógeno. Además, dichos autores no detectaban incorporación del DNA transformante y, debido a este hecho, postulan que no existen receptores con afinidad por el DNA en la superficie de los protoplastos. Los receptores presentes en las células se perderían durante el proceso de obtención de protoplastos. Sin embargo, no descartan la posi-

bilidad de un desenmascaramiento de proteínas con afinidad por DNA, presentes en la superficie de la membrana, que quedarían expuestas al exterior después de la eliminación de la pared celular.

PIECHOWSKA y cols. (1975) detectaron la formación de complejos entre el DNA homólogo y componentes de la membrana, en células competentes de B. subtilis. Realizando pruebas de competición en incorporación entre DNA homólogo y DNAs heterólogos procedentes de colifagos y de E. coli, SOLTYK y cols. (1975) observaron que el DNA de E. coli y del bacteriófago T^{*6} (mutante no glucosilado) eran capaces de competir con el DNA homólogo y formaban, al igual que dicho DNA, complejos con constituyentes celulares presentes en la membrana. PIECHOWSKA y cols. (1975) suponen que el DNA de E. coli competiría con el DNA homólogo en la formación de dichos complejos, los cuales podrían estar implicados en el transporte del DNA a través de la membrana celular o en la recombinación. El hecho de que el DNA de E. coli no se integre en el cromosoma bacteriano de B. subtilis (PIECHOWSKA y cols, 1975) parece indicar que el complejo DNA-membrana está implicado en la incorporación del DNA y no en su integración.

Los complejos formados por células competentes y DNAs homólogo y heterólogos son sensibles a la pronasa y al pH, pero no liberan DNA, incluso cuando se trata con sarcosil a 37° C. Sin embargo, se puede detectar DNA libre cuando se emplean tratamientos con NaCl a 70° C o con fenol a pH 8 y temperatura ambiente. Estas propiedades de los complejos recuerdan a las proteínas de las envueltas celulares relativamente sensibles a los

enzimas proteolíticos y a los detergentes, previamente descritas en otros sistemas (WORCEL y cols, 1974). Estos datos están de acuerdo con las observaciones de unión de DNA a membranas de B. subtilis detectadas mediante fraccionamiento de lisados celulares en un gradiente de renografina (DOOLEY y NESTER, 1973) o por autorradiografía (VERMEULEN y VENEMA, 1974 a).

Alguna luz sobre la posible función de dichos complejos puede ser dada por las experiencias de SOLTYK y cols. (1975) Dichos autores detectan formación de complejos con DNA monocatenario de E. coli y del bacteriófago T*6. Sin embargo, no observan complejos con DNA del fago T6 (el cual tiene 25% de sus residuos 5-hidroximetilcitosina unidos a dos moléculas de glucosa y 75% no glucosilado) que es incorporado por las células competentes en un porcentaje muy bajo. Parece razonable suponer que los constituyentes celulares implicados en la formación de tales complejos juegan algún papel en el transporte del DNA. Esta hipótesis está apoyada por las observaciones de EISENSTADT y cols. (1975), los cuales detectan, en células competentes, una proteína capaz de unir DNA monocatenario protegiéndolo contra la acción de las nucleasas.

Finalmente, se deduce de los resultados descritos previamente que:

(1) La especificidad de la formación de los complejos depende de la naturaleza del DNA.

(2) Las propiedades de estos complejos son similares a las de los formados con proteínas de membrana.

La formación de dichos complejos probablemente ocurra durante la incorporación del DNA, pero como es usual en los casos basados en técnicas de fraccionamiento celular, es difícil excluir que tales complejos se formen durante los procesos de lisis.

B.- ASOCIACION ENTRE DNA Y MEMBRANA IN VITRO

Con el fin de estudiar en profundidad las interacciones entre DNA y membrana, evitando las interferencias producidas por el metabolismo celular in vivo, se han empleado diversos sistemas in vitro que detallaremos seguidamente.

1. Interacción entre DNA y complejos pared-membrana

En el sistema de S. pneumoniae, SETO y cols. (1975) han realizado experiencias de unión de DNA a complejos pared-membrana procedentes de células competentes. Dichos autores observaron que estos complejos poseían una capacidad mayor de unión del DNA si se comparaba con los niveles detectados empleando una concentración equivalente de células competentes. Las propiedades de la unión del DNA a los complejos eran similares a las presentadas por células competentes. El pH y la temperatura óptimos eran muy parecidos, aunque no idénticos. La unión era estimulada por EDTA e inhibida por los mismos reactivos que inhiben la unión a células competentes. Finalmente, una fracción considerable del DNA unido por dichos complejos era resistente al tratamiento con desoxirribonucleasa pancreática.

Por otra parte, existían dos diferencias entre la unión del DNA a células competentes y a complejos pared-membrana:

(1) Los complejos parecen tener mayor número de receptores con gran afinidad por el DNA que una masa equivalente de células.

(2) Los complejos pared-membrana, a diferencia de las células competentes, no discriminan entre DNA mono y bicatenario

SETO y cols. (1975) suponen que los receptores específicos del DNA no son liberados durante el proceso de obtención de los complejos pared-membrana. Además, ya que los dos principales componentes de estos complejos (paredes y membranas) individualmente no unen cantidades apreciables de DNA, estos autores postularon que los polisacáridos presentes en la pared celular estabilizan, en tales complejos, los receptores específicos del DNA componentes de la membrana.

Por otra parte, el incremento de la capacidad de unión del DNA presente en los complejos, comparado con las células competentes, sugiere que en las células intactas sólo una fracción de todos los receptores potenciales presentes en ellas pueden unir DNA.

Finalmente, SETO y cols. (1975) trataron de explicar el hecho de que los complejos pared-membrana no discriminen entre DNA mono y bicatenario. Los autores sugirieron que la preferencia de las células por el DNA nativo es debido a que dichas moléculas pueden llegar hasta los receptores con más facilidad que el DNA monocatenario, no debiéndose este hecho a la existencia de dos receptores distintos para DNA nativo y DNA desnaturalizado. En las células intactas, el DNA bicatenario penetraría por los estrechos canales presentes en la pared celular alcanzando los receptores localizados en la membrana.

En el sistema de B. subtilis, HAMPTON y ARCHER (1976) han realizado experiencias de unión de DNA a complejos pared-membrana procedentes de células competentes y no competentes. Los dos tipos de complejos unían más cantidad de DNA que sus controles respectivos (células intactas), aunque los complejos procedentes de células no competentes unían sólo el 10% comparado con los complejos competentes. Este último resultado no concuerda con las observaciones de SETO y cols. (1975), en el sistema de S. pneumoniae, ya que estos autores obtenían los mismos niveles de unión de DNA empleando complejos procedentes de células competentes y de no competentes. SETO y cols. (1975) sugieren que en las células no competentes están presentes los receptores y que durante el desarrollo de la competencia se produce un desenmascaramiento de dichos receptores. Sin embargo, los resultados obtenidos en el sistema de B. subtilis (HAMPTON y ARCHER, 1976) parecen sugerir una discrepancia que reflejaría, al menos, una diferencia en el desarrollo de la competencia entre los dos sistemas.

2. Asociación entre DNA y mesosomas

Todos los resultados descritos en este capítulo y en el anterior parecen indicar que los receptores específicos del DNA están situados en la membrana. Sin embargo, no hemos expuesto, todavía la posibilidad de que la localización específica de dichos receptores se encuentre en los mesosomas (estructuras membranosas).

VERMEULEN y VENEMA (1974 b), en el sistema de B. subtilis, trataron de establecer la relación entre mesosomas y unión del DNA exógeno. Para ello, realizaron estudios autorra-

diográficos por microscopía electrónica con el fin de analizar la cinética y la ruta de transporte del DNA transformante, así como la localización inicial del DNA adsorbido irreversiblemente. Estos autores analizaron la cantidad de granos de plata depositados sobre la superficie celular, los nucleoides, los mesosomas y el citoplasma libre de estructuras. VERMEULEN y VENEMA (1974 b) encontraron que la densidad de los granos es inicialmente mayor sobre los mesosomas y sus alrededores, mientras que en las demás estructuras estudiadas y en el citoplasma la densidad es menor. Durante el transporte centrípeto del DNA exógeno hacia los nucleoides, no aparece un aumento de densidad en el citoplasma, aunque la densidad de los granos sobre los mesosomas y sus alrededores continúa siendo relativamente grande. Estos resultados sugieren que el DNA transformante está íntimamente asociado con las estructuras mesosómicas y que esta asociación persiste durante su emigración hacia los nucleoides.

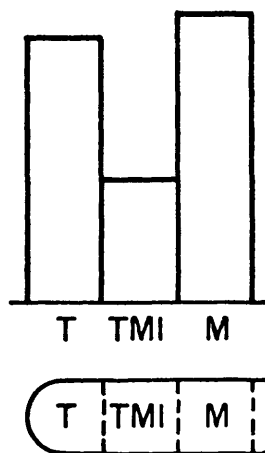
En otra experiencia, los autores emplearon como muestras para la autorradiografía secciones obtenidas de células, inmediatamente después de parar la incorporación del DNA con desoxirribonucleasa I. Determinaron la densidad relativa de los granos de plata situados en los mesosomas y en las zonas que los rodean hasta una distancia de 60 nm. Estas zonas incluyen parte de las envueltas celulares. La cantidad de granos depositados en las zonas que cubren la superficie celular y las que cubren el citoplasma son casi iguales. Además, la densidad de granos disminuye simétricamente en función de la distancia a los mesosomas. Estos resultados parecen también indicar que los mesosomas son los lugares de unión del DNA transformante, en el sistema de B. subtilis.

VERMUELEN y VENEMA (1974 b) pensaron que al existir dos tipos distintos de mesosomas, sería interesante determinar si el DNA transformante está asociado específicamente con ambos tipos de mesosomas o con uno sólo. Para ello, los autores compararon la distribución total de los mesosomas (sin distinguir los dos tipos) y la distribución de los granos de plata sobre las zonas celulares (T, TMI, M, MSI y S) observando que la distribución de ambos era muy similar (Fig. 13). Ya que la distribución de los dos tipos de mesosomas es completamente diferente en las zonas antes citadas, este resultado sugiere que tanto los mesosomas nucleares como los mesosomas de la membrana plasmática son capaces de unir DNA transformante.

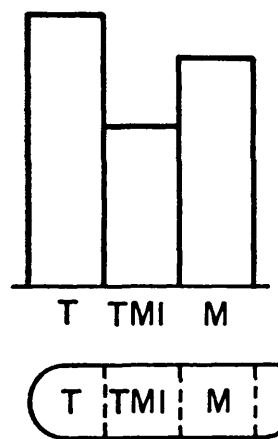
HAMPTON y ARCHER (1976) trataron las células en medio hipertónico con lisozima, provocando así la extrusión del contenido mesosómico en el medio. Después, separaban estas estructuras de los protoplastos mediante una centrifugación diferencial. Los protoplastos eran entonces lisados por suspensión en medio hipotónico, obteniendo la "fracción citoplásmica de la membrana". Estos autores realizaron pruebas de unión de DNA a las dos fracciones: mesosómica y citoplásmica. La fracción mesosómica unía 40 veces más DNA que la otra fracción. Estos resultados parecen indicar que los bajos niveles de unión obtenidos en la fracción citoplásmica no son significativos y podrían ser debidos a una baja proporción de mesosomas presentes en dicha fracción.

HAMPTON y ARCHER (1976) concluyeron que sus datos coincidían con la asociación entre DNA exógeno y mesosomas de-

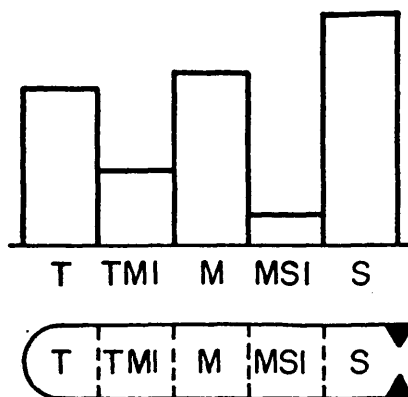
% granos de plata

CELULAS
SIN
SEPTO

% mesosomas



% granos de plata

CELULAS
CON
SEPTO

% mesosomas

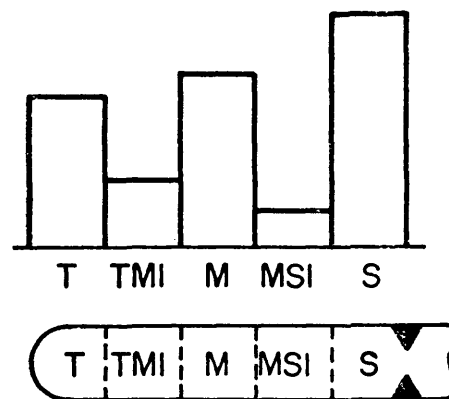


Fig. 13.- Distribución de granos de plata y mesosomas en varias zonas de células marcadas, con septo o sin él. T zona terminal; M zona media de la célula; TMI zona intermedia entre T y M; S zona del septo; MSI zona intermedia entre M y S (según VERMEULEN Y VENEMA, 1974 b).

tectada in vivo por VERMEULEN y VENEMA (1974 a, 1974 b) y, por tanto, dicha asociación no sería exclusivamente debida a la estructura y configuración de los mesosomas en la célula competente, sino también a la naturaleza fisicoquímica del material intramesosómico.

3. Asociación entre DNA y vesículas membranosas

Los apartados anteriores sugieren que algunas estructuras membranosas están implicadas en la adsorción del DNA.

Con el fin de realizar una aproximación experimental al problema, en sistemas in vitro, JOENJE y cols. (1974) aislaron vesículas membranosas, mediante tratamiento con lisozima en medio hipotónico, de cultivos competentes de B. subtilis. Dichas vesículas eran utilizadas para realizar experiencias de unión de DNA. Sus resultados muestran que las vesículas son capaces de unir DNA exógeno, siendo esta unión dependiente de la temperatura, ya que se realiza más lentamente, y alcanza unos niveles más bajos, a 0° C que a 30° C. La adición de magnesio al medio de reacción produce una disminución de los niveles de unión a 30° C pero no a 0° C. Esta observación se explica parcialmente por la presencia de una actividad nucleolítica dependiente del magnesio que interfiere con la formación del complejo. Por otra parte, la unión del DNA a vesículas se produce en un amplio rango de pH, con un óptimo a 4,5 y un pequeño máximo a 9,5.

La unión del DNA a las membranas parece requerir un DNA de elevado peso molecular, ya que el tratamiento con desoxirribonucleasa I destruye la afinidad del DNA por las vesículas.

Además, cuando se efectúa una rotura del DNA por fuerzas mecánicas a fragmentos de $1,2 \times 10^6$ Dalton, se produce una moderada pérdida de afinidad.

Es necesario resaltar que, el DNA monocatenario se une menos a las vesículas que el DNA nativo, sobre todo cuando hay magnesio en el medio. Así, cuando las experiencias de unión de DNA monocatenario se realizaban en presencia de EDTA, los niveles aumentaban significativamente. Este hecho podría explicarse por la inhibición de una nucleasa que requiriera magnesio y que degradara preferencialmente DNA monocatenario. Tal enzima nucleolítico ha sido detectado en el sistema de B. subtilis por BIRNBOIM (1966).

El tratamiento de los complejos DNA-vesículas membranosas con desoxirribonucleasa I produce una eliminación del 80% del DNA unido. La fracción restante de dicho DNA unido, parece también haber sido degradada por el enzima. Ya que la desoxirribonucleasa no entra en el interior de las vesículas, JOENJE y cols. (1974) concluyen que el DNA está localizado en la superficie externa de dichas estructuras.

Por otra parte, los mismos autores comprobaron que las curvas de respuesta a la dosis (cantidad de DNA unido frente a concentraciones de DNA) obtenidas en vesículas, presentaban distinto comportamiento que las curvas de transformación obtenidas con células intactas. La cantidad de DNA unido por las vesículas seguía aumentando hasta una concentración de DNA superior a $100 \mu\text{g/ml}$, mientras que, en las células para la transformación, se encuentra un nivel de saturación definitivo a

1 μ g/ml de DNA. Sin embargo, los niveles de unión detectados empleando células siguen aumentando para una concentración de DNA superior a 1 μ g/ml. Esto indicaría que las células poseen receptores no implicados en la transformación genética y que parte del DNA unido no sería activo en la transformación.

JOENJE y cols. (1975), en el sistema de B. subtilis realizaron experiencias de unión de DNA transformante a vesículas membranosas procedentes de un cultivo fraccionado por gradientes de renografin. Tanto las vesículas aisladas a partir de la fracción competente como las de la fracción no competente eran capaces de unir el DNA. Sin embargo, las vesículas competentes poseían mayor capacidad de unión que las no competentes.

Los dos tipos de subpoblaciones presentaban 3 niveles de saturación en las curvas de respuesta a la dosis. Estos niveles sugieren la existencia de tres tipos de receptores con diferente afinidad por el DNA, siendo saturados a 1, 10 y 70 μ g/ml de DNA respectivamente.

Los resultados de estos autores parecen indicar la presencia de un mayor número de receptores accesibles, por microgramo de proteína, en las vesículas competentes que en las no competentes y, además, los receptores con mayor afinidad (saturados con 1 μ g/ml de DNA) serían los más abundantes. Es probable que este tipo de receptores esté implicado en el proceso de transformación.

El hecho de que las vesículas obtenidas de células no competentes sean capaces de unir DNA mientras que células no competentes no lo unan, parece indicar que los receptores del DNA estarían presentes en las células no competentes, pero la pared celular los enmascararía. De este modo, la adquisición del estado de competencia requeriría un cambio en dicha pared para permitir que el DNA interaccione con los receptores. Este modelo sería similar al descrito en el sistema de S. pneumoniae (SETO y TOMASZ, 1975 a).

VIII. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

A la vista de la revisión bibliográfica previamente expuesta, podemos concluir que, aunque los mecanismos íntimos de la transformación bacteriana se van clarificando, aún quedan numerosas incógnitas por ser resueltas.

Entre estas incógnitas, caben destacar los procesos implicados en las etapas de unión e incorporación del DNA exógeno. Aunque, indudablemente, en el sistema de S. pneumoniae los progresos realizados en los últimos años han sido muy notables, no es éste el caso en los otros sistemas de transformación, especialmente en B. subtilis. A pesar de las evidentes diferencias entre ambos sistemas microbianos, recientemente se está intentando establecer un paralelismo cada vez más estrecho entre los mecanismos de transformación de pneumococos y B. subtilis. No obstante, este paralelismo puede ser artificioso, dado que se conoce muy poco acerca de las primeras etapas de la incorporación del DNA en B. subtilis. Así, por ejemplo, los modelos que se han postulado para estas etapas en pneumococos, se han

pretendido extender a B. subtilis, sin que existan pruebas experimentales directas que apoyen esta hipótesis. Nuestro trabajo experimental pretende arrojar alguna luz sobre esta problemática, dado que nos parece apasionante el desentrañar los procesos que permiten a una pequeña célula bacteriana el reconocer, procesar e incorporar las macromoléculas de DNA.

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

I. MATERIAL Y METODOS

En este capítulo se detallarán las estirpes bacterianas y los bacteriófagos empleados en la parte experimental, así como los medios de cultivo y las técnicas utilizadas.

A.- MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO

1.- Estirpes bacterianas y bacteriófagos.

En el cuadro IV aparecen recogidas las bacterias y los fagos empleados en nuestro trabajo, así como sus marcadores genéticos y procedencia.

2.- Medios de cultivo

Los medios de cultivo líquidos empleados para la multiplicación y puesta en competencia de las distintas estirpes de B. subtilis fueron el descrito por BOTT y WILSON (1968), denominado BW, y los medios GM1 y GM2 descritos por YOUNG y WILSON, (1972).

CUADRO IV.- Estirpes bacterianas y bacteriófagos empleados en esta Tesis

MICROORGANISMOS	CARACTERISTICAS GENETICAS	ESTIRPE ORIGINAL	PROCEDENCIA
<u>Bacterias</u>			
<u>B. subtilis</u> RUB 300	lys-3 met-B10 his-B2	168	F.E. YOUNG
<u>B. subtilis</u> RUB 305	ery ^r str ^r rfm ^r lys-3 trp-C2 met-B10	168	F.E. YOUNG
<u>B. subtilis</u> OG1	protótrofa	168 G	G. VENEMA
<u>B. subtilis</u> 1G20	trp-C2 ⁻	168 G	G. VENEMA
<u>B. subtilis</u> 2G7	ind ₁₆₈ ⁻ thy ⁻	168 G	G. VENEMA
<u>B. subtilis</u> AR1	his ₂ ⁻ trp ₂ ⁻	SB25	E.W. NESTER
<u>B. subtilis</u> MCB (antigua MC1)	trp ⁻	168 M	T.A. TRAUTNER
<u>M. lysodeikticus</u>	ade ⁻	ATCC4698	American Type Culture Collecti
<u>E. coli</u> K704	trp ⁻	K12	G. VENEMA
<u>Bacteriófagos</u>			
SPP1	tipo salvaje	aislado de <u>B. subtilis</u>	T.A. TRAUTNER
T4	tipo salvaje glucosilado (1)	aislado de <u>E. coli</u>	G. VENEMA
T*4	α r/34 mutante bloqueado para α -glucosil y β -glucosil transferasas	aislado de <u>E. coli</u>	G. VENEMA

(1) El DNA de este fago tiene todos los residuos de 5-hidroximetil citosina unidos a una molécula de glucosa

a) Medio BW

KH_2PO_4	7,6 g
K_2HPO_4	12,4 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	2 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,72 g
Citrato trisódico	1 g
Glucosa	5 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml
pH = 6,7		

El medio de BOTT y WILSON completo (BWC) fué modificado por WILSON y BOTT (1968) y contiene, además de los componentes del BW, 25 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los siguientes aminoácidos: histidina, triptófano, arginina, valina, lisina, treonina, glicocola, metionina y asparragina.

b) Medio GM1

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,2 g
$\text{K}_2\text{H PO}_4$	0,4 g
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0,6 g
Citrato trisódico	0,1 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Glucosa	0,5 g
Extracto de levadura	0,1 g
Hidrolizado de caseína	0,02 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	100 ml
pH = 7,0		

c) Medio GM2

GM1	100 ml
CaCl ₂	5,55 mg
MgCl ₂	23,8 mg

d) Medio TY

El medio TY fue empleado para la multiplicación de la estirpe MCB de B. subtilis con el fin de aislar el bacteriófago SPP1. La composición de dicho medio se detalla a continuación:

Tryptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	1,2 g
Mn SO ₄	0,151 g
NaCl	5 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml
pH = 7,3	

e) Medio M-9

Este medio fue utilizado para multiplicar E. coli K704 y así poder aislar los fagos T4 y T*4.

NH ₄ Cl.	1 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
Glucosa	5 g
MgSO ₄	0,4 g
Adenina	10 mg

Citosina	10 mg
Uracilo	10 mg
Tiamina	5-mg
Casaminoácidos (sin vitaminas)	2,5 g
Triptófano	50 mg
Desoxiadenosina	0,25 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml

f) Medio TY sólido

Para el recuento de células viables se emplearon placas de TY:

Extracto de levadura	5 g
Bacto-Triptona	10 g
NaCl	5 g
MnSO ₄	0,151 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	

g) Medio mínimo para placas

En los experimentos de transformación se emplearon placas de medio mínimo (MM):

KH ₂ PO ₄	6 g
K ₂ HPO ₄	10 g
Citrato trisódico	0,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,6 g
Glucosa	10 g

Valina	50 mg
Lisina	50 mg
Treonina	50 mg
Asparragina	50 mg
Glicocola	50 mg
Arginina	50 mg
Histidina	50 mg
Bacto Agar	21 g
Agua destilada y desionizada c.s.p	1000 ml

3.- Soluciones

a). Para la obtención de vesículas membranosas se emplearon los tampones fosfato 0,1 M y 0,05 M a pH 7 y 8 respectivamente. Para preparar estos tampones se utilizaron soluciones stock de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 1M, diluyendo a la molaridad adecuada y ajustando el pH al valor deseado.

b). Como disolvente de los DNAs bacterianos y fágicos se empleó la solución citrosalina estándar (SCS) cuya composición es:

NaCl	8,4 g
Citrato trisódico	4,4 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml

c). Para realizar las diluciones de recuento de células viables y transformantes se empleó solución salina:

NaCl	8,5 g
Agua desionizada y destilada c.s.p.	1000 ml

d). Las soluciones de desoxirribonucleasa pancreática I (DNasa) (con una actividad de 90 unidades/ μ g) se prepararon en MgSO_4 0,5 M a una concentración final de 10^4 unidades/ml. La solución así obtenida se distribuyó en tubos con 1 ml y se guardó congelada a -20°C . Antes de su empleo, la DNasa fue descongelada rápidamente en un baño a 45°C . Después de su uso se almacenó a 4°C , evitando nuevas congelaciones posteriores.

e). Como diluyente de los bacteriófagos se utilizó la solución denominada TBT, cuya composición se indica a continuación:

NaCl	5,84 g
Tris (hidroximetil)aminometano	12,1 g
MgCl_2	2,03 g
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7,2 con HCl fumante.

4. Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados pertenecen a la casa comercial MERCK (Darmstadt, Alemania), excepto los que se indican a continuación: DNasa I y lisozima de Worthington Biochemical Co.; extracto de levadura, Bacto Triptona y caseaminoácidos sin vitaminas de Difco Laboratorios; seroalbúmina bovina de Sigma Chemical Co.; sacarosa de British Drug House Ltd (BDH); ^3H -timidina de The Radiochemical Centre Amersham; Readysolv Solution VI de Beckman; Instagel de Packard Instruments Co;

B. TECNICAS

1. Obtención de DNA bacteriano

a) Extracción y purificación del DNA transformante

El DNA bacteriano se obtuvo de las estirpes de B. subtilis OG1 y RUB 305 y de M. lysodeikticus.

Las células bacterianas que han estado multiplicándose hasta alcanzar el final de la fase logarítmica a 37° C en un agitador New Brunswick R-26 a 250 rpm se centrifugan a 4000xg durante 15 minutos en una centrífuga Beckman J21 B, en frío y se lavan con solución salina y EDTA a pH 8. El sedimento se pesa y se resuspende en solución salina con EDTA (0,15 M NaCl y 0,1 M EDTA a pH 8), añadiendo 10 ml de la solución por cada g de peso fresco de células.

Se calienta a 30° C y se añade lisozima (40 mg por g de células) mezclando con varilla de vidrio. La mezcla se calienta a 37° C en baño maría y se incuba durante 1 hora.

Una vez lisado el cultivo se añade dodecilsulfato sódico (SDS) para dar una concentración final del 1%, prosiguiendo la incubación a 37° C durante 30 minutos más.

A continuación se añade una solución de pronasa en NaCl 0,01 M (autodigerida a 37° C durante 2 a 3 horas) para dar una concentración final de 2 mg por ml, incubando a 37° C de 2 a 4 horas. Después se adiciona una solución de ribonucleasa

en NaCl 0,15 M a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para eliminar el RNA presente en los extractos celulares. La RNasa se ha digerido previamente a 80° C durante 10 minutos para destruir cualquier posible actividad DNásica contaminante. Este tratamiento se prosigue durante 60 minutos a 37° C.

Seguidamente el extracto se fenoliza, adicionándole fenol recién destilado saturado con TBT, volumen a volumen (v/v). La mezcla se agita suavemente a temperatura ambiente durante unos 5 minutos y a continuación se centrifuga durante 10 minutos a 7800xg en el rotor JA20 en frío. La fase acuosa se trata con fenol de nuevo como hemos indicado previamente y por último se dializa contra SCS a 4° C durante 24 horas, haciendo varios cambios. Posteriormente, se vuelve a tratar con RNasa (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2 horas a 37° C y se repite la fenolización. Después de dializar contra SCS durante 24 horas la muestra de DNA purificado se precipita con dos volúmenes de etanol frío y se disuelve en SCS.

b) Extracción y purificación del DNA bacteriano tritiado

Para la obtención de este DNA se ha empleado la estirpe 2G7 de B. subtilis inoculada en 100 ml de medio BW mínimo (sin aminoácidos) suplementado con 2,5 mg por ml de casaminoácidos, 50 μg por ml de triptófano, 1 μg por ml de timina fría y 1 mCi de ^3H -metiltimidina. Se incuba a 37° C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se centrifuga el cultivo a 4000xg durante 15 minutos en un rotor JA 10 y se lava con solución salina-EDTA, pH 8.

El sedimento se utiliza para purificar el DNA tritiado de forma similar a como se ha descrito para el DNA frío.

La actividad específica del ^3H -DNA variaba entre 60.000 y 120.000 cpm/ μg .

2. Purificación de los bacteriófagos

a) Aislamiento del fago SPP1

Se inoculan 200 ml de medio TY con la estirpe B. subtilis MCB (SPATZ y TRAUTNER, 1970) y se incuban a 37° C, con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 550 nm de 0,60, que corresponde a un número de viables de 10^8 células/ml. Entonces se añade el fago al cultivo para dar una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 1/75 a 1/100, es decir, una partícula de fago por cada 75 ó 100 bacterias.

Una vez que el cultivo ha sido infectado con el fago, se prosigue la incubación a 37° C con agitación durante 4 horas más. A continuación se añade cloroformo en una proporción 1/50 para eliminar las células bacterianas que pudieran quedar vivas. Después de 30 minutos, se adiciona DNasa a una concentración de 10^4 unidades para 250 ml de cultivo, y se incuba durante 10 minutos más a 37° C. Seguidamente, se centrifuga la muestra a 2000xg durante 15 minutos a 4° C, en un rotor JA10. El sobrenadante que contiene el fago, se trata con NaCl a una concentración final de 0.5 M y polietilenglicol (PEG) al 10% (concentración final) durante 16 horas. Después de realizado este tratamiento, el lisado se centrifuga a 2000xg durante 15 minutos en un rotor JA10, resuspendiendo el sedimento en solución salina.

La suspensión de fago obtenida se centrifuga a 4° C en gradientes preformados de CsCl a 100.000xg durante 120 minutos en una ultracentrífuga Spinco, modelo L-2, empleando un rotor de ángulo fijo 40Ti. El fago se separa en una zona próxima al fondo del tubo y después de ser extraído por punción del tubo se dializa contra TBT a 4° C durante 24 horas.

En la figura 14 se muestra una fotografía al microscopio electrónico del bacteriófago SPP1 purificado. Para ello, a una gota de la suspensión del fago se añadió otra gota de una disolución de fosfotungstato sódico al 2%, pH 7. Una gota de la mezcla fue depositada sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono. El exceso de líquido, una vez transcurrido 5 minutos, se elimina mediante un papel de filtro y las muestras se examinan en un microscopio electrónico Philips EM 300 a 80 Kv.

b) Aislamiento de los fagos T4 y T*4

La bacteria E. coli K704 se inocula en el medio TY y se incuba a 37° C con agitación hasta que alcanza una D.O. a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,40. En ese momento se infecta el cultivo con los fagos (un cultivo para cada tipo de fago), para dar una multiplicidad de infección (m.d.i) de 0,1. Se prosigue la incubación en las mismas condiciones durante 4 horas y después se emplea el mismo procedimiento de aislamiento y purificación descrito para el fago SPP1.

En las figuras 15 y 16 se muestran microfotografías de los bacteriófagos T4 y T*4 realizadas en las mismas condiciones que para el bacteriófago SPP1.

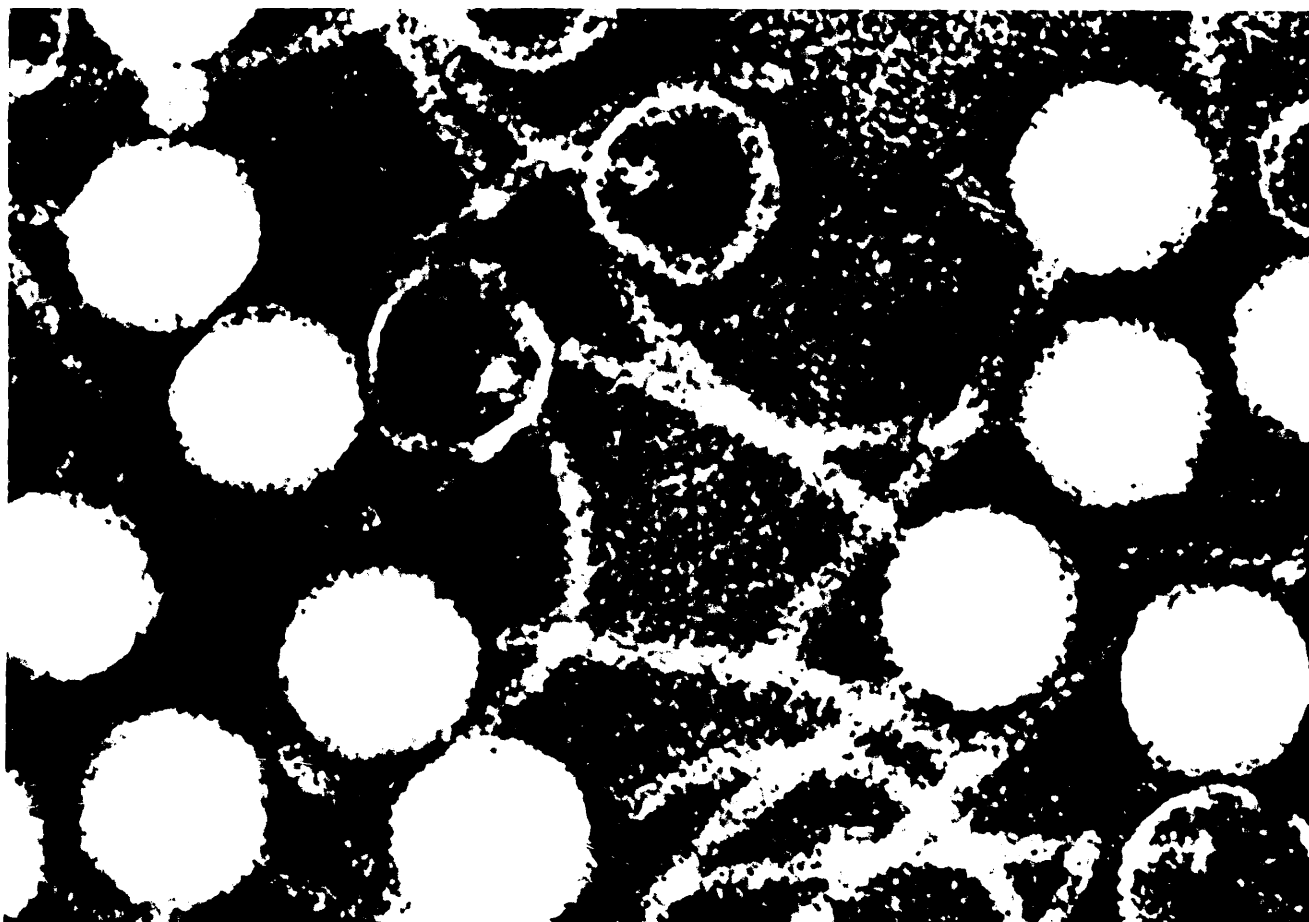


Fig. 14.- Microfotografía del bacteriófago SPP1 purificado
(x343.000)

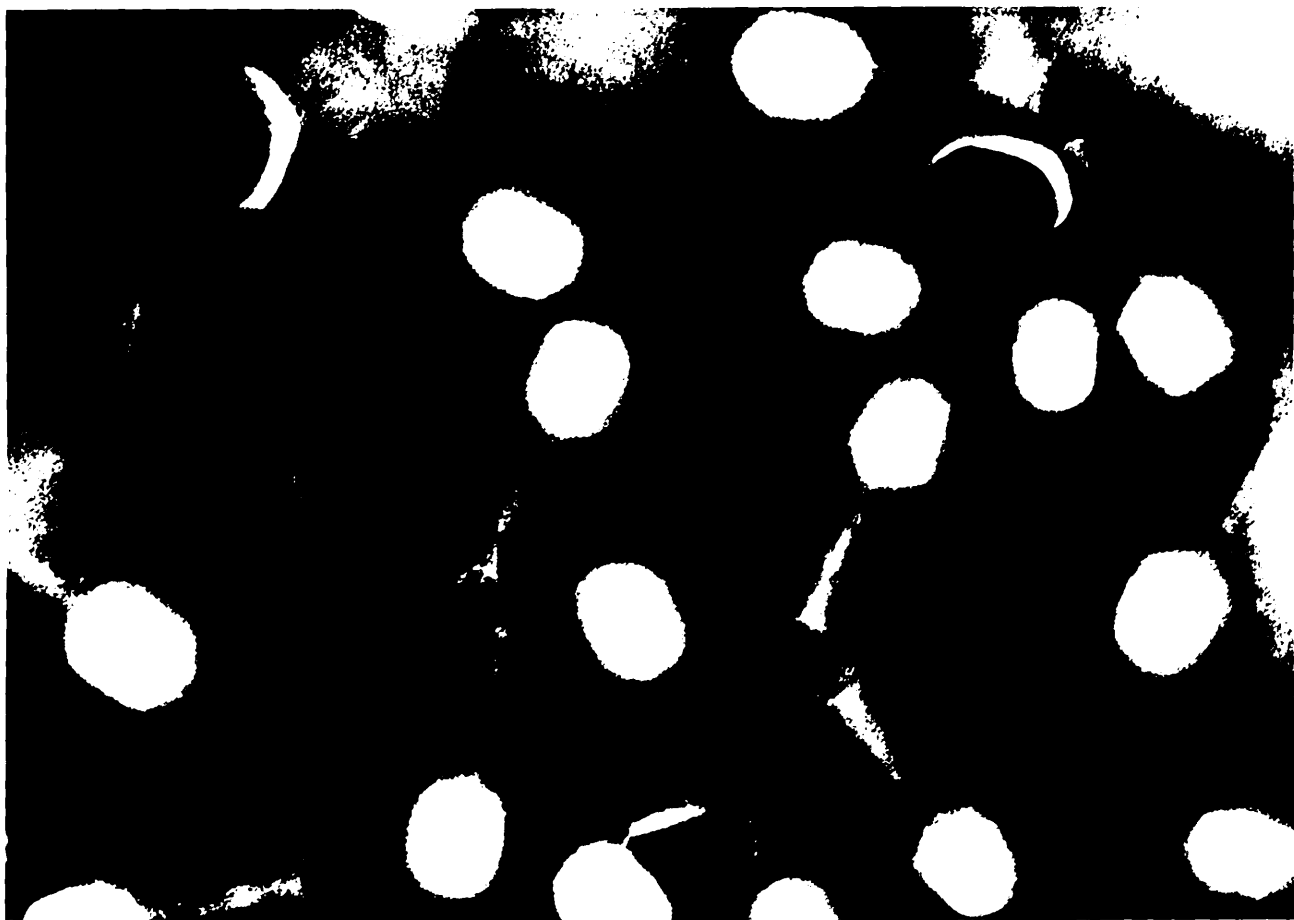


Fig. 15.- Microfotografía del bacteriófago T4 purificado
(x147.000).



Fig. 16.- Microfotografia del bacteriófago T*4 purificado (x97.500).

c) Aislamiento de los fagos T4 y T*4 tritiados

Se inocula el medio M9 con la bacteria E. coli K704 para dar una D.O. a 600 nm inicial de 0,20. Cuando el cultivo alcanza una D.O.₆₀₀ de 0,80, se infecta con los fagos, adicionando al mismo tiempo triptófano a una concentración de 50 µg/ml. La m.d.i. utilizada con los dos fagos es de 5. Después de 10 minutos de incubación, se añaden 20 µCi/ml de ³H-metiltimidina y se prosigue la incubación a 37° C, con agitación durante unas 4 horas, hasta que se produce la lisis. Seguidamente se procede al aislamiento de los fagos como se ha descrito previamente.

3. Extracción de los DNAs fágicos

El fago purificado se diluye hasta dar un título aproximado de 2×10^{12} unidades formadoras de placas por ml, diluyendo con TBT. A la suspensión fágica se le añade un volumen igual de fenol recién destilado saturado con TBT, y después, agitando suavemente a temperatura ambiente durante 5 minutos, se observa un gran aumento de viscosidad. La muestra se centrifuga a 4° C durante 10 minutos a 7800xg en un rotor JA20. La fase acuosa se trata de nuevo con fenol tal como hemos indicado y, por último, se dializa frente a SCS a 4° C durante 24 horas, realizando varios cambios.

La actividad específica de los DNAs tritiados variaba de 60.000 a 120.000 cpm/µg.

4. Determinación de DNA, RNA y proteínas.

a) Valoración de DNA

Se ha empleado el método de medida espectrofotométrica directa del DNA. Dicha valoración está basada en el hecho de que los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a una $D_{0.260}$. Este método se emplea para determinar la concentración de DNA en muestras purificadas, teniendo en cuenta que una absorción de 1,0 corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de éste ácido nucleico. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman, modelo 25.

b) Valoración de RNA

Las determinaciones de RNA se realizaron empleando el método del orcinol (SCHNEIDER, 1957). Para preparar el reactivo del orcinol, se disuelve 1 g del producto, inmediatamente antes de usar, en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado, conteniendo 0,5 g de cloruro férrico. Una vez preparado el reactivo, se adiciona 1,5 ml de éste a 0,2 ml del extracto que contiene RNA. Después, se calienta la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Finalmente se valora la cantidad de RNA midiendo la absorbancia de la muestra a 660 nm. Como controles se empleaban diluciones de RNA a concentraciones que variaban entre 500 y 10 $\mu\text{g/ml}$ y se utilizaban como muestras para determinar su $D.O._{660}$, construyéndose una curva patrón que permite determinar la concentración de RNA en la muestra problema.

c) Valoración de proteínas

En este trabajo experimental se ha utilizado el método de LOWRY y cols. (1951). Para ello se preparan las siguientes soluciones:

Solución A, formada por: 1,44 g de carbonato sódico disueltos en 48 ml de hidróxido sódico 1 N; 40 mg de tartrato sódico potásico disueltos en 1 ml de H₂O; 20 mg de sulfato de cobre en 1 ml de agua.

Solución B, preparada a partir del reactivo del fenol de Folin-Ciocalteus, diluyendo 3,5 ml de este reactivo en 7 ml de agua.

Se procede adicionando 2 ml de la solución A a 200 μ l de la muestra problema, se mezclan y se mantienen durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se añaden 0,2 ml de la solución B mezclando rápidamente con agitación fuerte. Se deja la mezcla de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 660 nm frente a un blanco con 0,2 ml de agua como muestra.

Para determinar la concentración de proteínas presentes en la muestra es necesario hacer una curva de calibrado con seroalbúmina bovina a concentraciones de 100 a 500 μ g/ml y comprobar a qué concentración de proteínas corresponde la D.O. de la muestra problema.

5. Curvas de crecimiento

El crecimiento bacteriano puede ser detectado midiendo la turbidez del cultivo a distintos tiempos. Las determinaciones de densidad óptica de los cultivos se realizaron a 550 nm,

mientras no se indique lo contrario, utilizando un espectrofotómetro Bausch & Lomb. modelo Spectronic 20. Paralelamente, se realizan recuentos de viabilidad celular en placa, utilizando las diluciones apropiadas según el método habitual.

6. Métodos de puesta en competencia

a) Método de BOTT y WILSON (1968) modificado por GARCIA (1974).

A partir de una placa de TY, almacenada a temperatura ambiente, en la que se mantienen aisladas colonias de la estirpe de B. subtilis deseada, se inocula una colonia en un matraz que contiene medio TY y se incuba a 37° C, con agitación (250 rpm) durante 10-14 horas. El cultivo se centrifuga y las células se resuspenden en medio BW, suplementado con 25 µg/ml de cada uno de los requerimientos auxotróficos de la estirpe empleada. La suspensión se distribuye en una serie de matraces de monod, en los cuales se ajusta una D.O.₅₀₀ que varía entre 0,01 y 0,08. Los cultivos se incuban a 37° C agitando a 250 rpm durante toda la noche. A la mañana siguiente se selecciona el matraz cuya D.O. indique que el cultivo esté terminando la fase de latencia. Cuando comienza la fase exponencial se van tomando muestras del cultivo para ensayos de viabilidad y competencia. El máximo de competencia se sitúa al tiempo $T_{2,5}$, es decir 2,5 horas después del cese de la fase exponencial de crecimiento (T_0).

b) Método de YOUNG y WILSON (1972)

Se inocula un matraz de monod, que contiene 10 ml de GM1, con una colonia de la estirpe de B. subtilis que quiere ser puesta en competencia. Dicho inóculo se incuba en una

estufa a 30° C sin agitación durante 14-16 horas, teniendo la precaución de que el medio se encuentre situado en la prolongación lateral del matraz.

Después de este período de tiempo se coloca el matraz de monod en un incubador con agitación (350 rpm) a una temperatura de 37° C y se prosigue la incubación leyendo la DO₅₅₀ cada 15 minutos. Noventa minutos después de que las células han abandonado la fase exponencial, se añade al cultivo dimetilsulfóxido al 5% y se congelan las células rápidamente en una mezcla de alcohol y nieve carbónica, almacenando dicho cultivo en un congelador Harris a -70° C.

Cuando se deseaba utilizar un cultivo competente, las muestras eran rápidamente descongeladas y diluidas 1:10 en medio GM2, procediendo a incubar las células a 37° C con agitación (350 rpm) durante 1 hora más. En este tiempo se encuentra situado el máximo de competencia.

c) Método de JOENJE y cols. (1975)

Los cultivos competentes son obtenidos inoculando con una colonia de la estirpe bacteriana deseada 500 ml de medio mínimo de BW suplementado con 200 μ g/ml de hidrolizado de caseína y 25 μ g/ml de los requerimientos auxotróficos. El cultivo se incuba a 37° C, con agitación vigorosa (350 rpm) durante toda la noche. Por la mañana, se diluye dicho cultivo con medio BWC para dar una DO₅₀₀ de 0,12-0,14. Después, se prosigue la incubación en las mismas condiciones durante 6 a 7 horas, que es cuando se alcanza la competencia máxima.

7. Procedimiento de transformación

a) Método usual

A muestras de 0,45 ml de células que han alcanzado el estado de competencia por cualquiera de los procedimientos previamente descritos, se adiciona 0,05 ml de una solución de DNA preparada a 10μ g/ml y la mezcla es incubada a 350 rpm y a 37° C. Después de 45 minutos de incubación, salvo en las experiencias que se indiquen en los resultados, se para la reacción añadiendo 50 unidades de DNasa I continuando la incubación durante 5 minutos más.

Las diluciones de la muestra del cultivo se hicieron en solución salina y se sembraron sobre placas de medio mínimo.

b) Transformación en presencia de EDTA

Se añaden distintas concentraciones de EDTA a un cultivo competente incubando a 37° C durante 5 minutos. Después se adiciona DNA (1μ g/ml) y se prosigue la incubación durante 20 minutos más. A continuación, se añaden distintas concentraciones de magnesio y se para la transformación adicionando DNasa I a los tiempos y concentraciones indicados en los resultados. Los controles se realizan añadiendo a los cultivos agua destilada y desionizada en lugar de EDTA.

8. Cálculo del número de células viables y transformantes

Para determinar el número de células viables en un cultivo bacteriano se hacen diluciones del mismo en solución

salina, tomando 0,1 ml de la dilución deseada y añadiendo el inóculo sobre una placa de TY para distribuirlo homogéneamente con una espátula bacteriológica. Estas placas se incuban en una estufa a 37° C durante 14 a 18 horas.

El número de transformantes presentes en un cultivo se determina diluyendo apropiadamente este cultivo con solución salina y adicionando 0,1 ml de esta dilución a una placa de MM. Se distribuye el inóculo con espátula y se incuban las placas en estufa a 37° C hasta que las colonias transformantes son visibles (18 a 20 horas).

9. Determinación de radioactividad.

Para determinar la radioactividad de una muestra dada se procedió a lisarla. En el caso de las células, los complejos pared-membrana y las paredes, la lisis se efectuó por adición de lisozima (500 μ g/ml) e incubando las muestras durante 30 minutos a 37° C en estático. Los protoplastos eran resuspendidos en medio hipotónico para provocar su destrucción y agitados fuertemente.

Las vesículas membranosas eran disueltas por adición de SDS al 5% y posterior incubación a 37° C en estático durante 30 minutos.

Las muestras así tratadas (1 ml) eran colocadas en un vial junto con 5 ml de líquido de centelleo (Readysolv o Instagel) y contado en un contador de centelleo líquido Inter-technique. El fondo (entre 20-50 cuentas por minutos (cpm)) se restaba de las cuentas de cada ensayo.

10. Unión e incorporación de DNA a las células

a) Unión del DNA

Los cultivos competentes eran centrifugados y resuspendidos en medio fresco para dar una concentración final de 10^8 células/ml. Seguidamente se adicionaba DNA tritiado ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) a las muestras y se incubaba la mezcla de reacción a 37° C con agitación (350 rpm) durante 10 minutos (salvo en los casos indicados en los resultados). Después de la exposición al DNA, las muestras eran colocadas en frío y diluidas (1:1) con medio fresco (colocado en hielo), para parar la reacción. Entonces se centrifugaban las suspensiones a 4° C , a $7800\times g$ durante 10 minutos, empleando un rotor JA20. Después, las muestras se lavaban dos veces empleando el medio apropiado para cada caso. Los sedimentos se lisaban como hemos descrito previamente y se contaba la radioactividad de las muestras.

b) Incorporación del DNA

Los cultivos competentes se centrifugaban y concentraban para dar aproximadamente 10^8 células viables/ml. A estas muestras se añadía DNA tritiado ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) y después de incubar a 37° C durante 20 minutos con una agitación de 350 rpm, se adicionaba DNasa I (1000 unidades/ml) prosiguiendo la incubación en las mismas condiciones durante 10 minutos más. Después, las muestras eran centrifugadas en un rotor JA20 a $7800\times g$ durante 10 minutos en frío y lavadas dos veces con medio sin magnesio. Finalmente se procedía a lisar las células y a medir la radioactividad presente en las muestras.

11. Aislamiento de protoplastos y unión de DNA a dichas estructuras.

a) Aislamiento de protoplastos

Cultivos celulares que habían estado multiplicándose en un medio que permitía el desarrollo de la competencia eran centrifugados en frío a 5500xg en un rotor JA10 durante 15 minutos. El sedimento era concentrado unas 10 veces para dar un título de $2-3 \times 10^8$ células viables/ml resuspendiéndolo en el mismo medio suplementado con sacarosa al 20%. Posteriormente, se añadía lisozima ($500 \mu\text{g/ml}$) al cultivo y se incubaba a 37°C con agitación ocasional durante unos 30 minutos. Después, se visualizaban los protoplastos por observación con un microscopio de contraste de fase Leitz Weltzar Orthoplan. Cuando más del 95% de las células se habían convertido en protoplastos, el cultivo se centrifugaba a 7800xg rpm durante 10 minutos en frío, empleando un rotor JA20. Los protoplastos se resuspendían en medio suplementado con sacarosa al 20% precalentado.

b) Unión del DNA a protoplastos

Se añadía DNA tritiado ($1 \mu\text{g/ml}$) a los protoplastos previamente obtenidos y se procedía a incubar la mezcla durante 10 minutos, a 37°C con agitación fuerte (350 rpm). Después de 10 minutos se añadía igual volumen de medio frío sin magnesio con sacarosa al 20% y se centrifugaba el cultivo inmediatamente a 7800xg, a 4°C , 10 minutos en un rotor JA20. El sedimento se lavaba 2 veces con el mismo medio y finalmente era lisado y contado.

12. Aislamiento de complejos pared-membrana, paredes y su unión con el DNA.

a) Aislamiento de complejos pared-membrana y paredes

Para la obtención de dichos complejos se emplearon 2 l de un cultivo competente. Una vez desarrollada la competencia, se determina el peso seco de las células después de haberlas centrifugado a 5500xg 15 minutos, en frío, empleando un rotor JA10. Las células se resuspenden en 4 ml de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,0 en frío y se añaden al cultivo 6 g de ballotini nº13 previamente lavados con ácido. La muestra así preparada se somete a rotura mecánica en un desintegrador Sorvall, 8 veces, durando cada tratamiento 1 minuto y dejando intervalos de 0,5 minutos entre ellos.

La muestra se centrifuga a 350xg durante 5 minutos en frío en un rotor JA20 y se guarda el sobrenadante. Los complejos que han quedado asociados a los ballotini se recuperan por repetidas resuspensiones de ellos en el mismo tampón. Se recogen todos los sobrenadantes y se sedimentan los complejos por centrifugación a 6000xg durante 20 minutos a 4° C en un rotor JA20.

El sedimento final, formado por los complejos pared-membrana se resuspende en el medio empleado y se congela a -70° C en pequeños volúmenes.

Las paredes se aislaron a partir de estos complejos por tratamiento con SDS al 0,2% y lavado exhaustivo (13 veces) en tampón fosfato 0,05 M pH 7, guardándose congeladas a -70° C.

b) Unión del DNA a los complejos pared-membrana y a paredes

Con el fin de llevar a cabo estas experiencias de unión, se adicionaba 1 µg/ml de DNA tritiado a 10^8 equivalentes

celulares/ml, incubando durante 10 minutos a 37° C con agitación fuerte (350 rpm). Después, se diluye (1:1) la muestra con medio frío y se centrifuga a 12000xg, 10 minutos a 4° C con un rotor JA20. A continuación se lava el sedimento dos veces en las mismas condiciones, resuspendiéndolo suavemente. Por último se solubilizan las muestras y se cuenta la radioactividad asociada a ellas por el procedimiento antes descrito.

13. Aislamiento de vesículas membranosas y unión del DNA a éstas

a) Obtención de vesículas membranosas

El procedimiento empleado es el descrito por JOENJE y cols. (1974), pero nosotros lo hemos modificado eliminando el tratamiento con 15mM EDTA.

Se emplea 1 l de cultivo de B. subtilis RUB 300 que ha sido puesto en competencia según el método de YOUNG y WILSON (1972), pero realizando la incubación en medio GM2 durante 2 horas a 37° C con una agitación de 350 rpm. Después, se centrifuga el cultivo a 3800xg, durante 15 minutos en frío, empleando un rotor JA10. El sedimento se resuspende en 100 ml de tampón fosfato 0,05 M, pH 8 suplementado con 200 µg/ml de lisozima incubando a 37° C durante 15 minutos con agitación suave (125 rpm). Seguidamente, se comprueba que la lisis celular se ha producido empleando un microscopio de contraste de fase. Con el fin de eliminar el DNA y el RNA celulares, las vesículas membranosas obtenidas se tratan con 10 µg/ml de DNasa y 10 µg/ml de RNasa, adicionando al mismo tiempo sulfato magnésico 10 mM e incubando en las mismas condiciones durante 15 minutos más.

A continuación, se centrifuga a 350xg durante 5 minutos, a 4° C en un rotor JA20 para eliminar las células que han quedado intactas. El sobrenadante obtenido en esta centrifugación, que contiene las vesículas, es nuevamente centrifugado en el mismo rotor a 12000xg durante 30 minutos, en frío. El sedimento se resuspende en tampón fosfato 0,1 M, pH 7 homogeneizándolo bien en un homogeneizador del tipo Potter-Elvehjem. Finalmente, el sedimento es lavado 3 veces a 12000 xg durante 15 minutos, resuspendiéndolo cada vez en el mismo tampón y homogeneizando el sedimento. Después de la última centrifugación las vesículas membranosas se resuspenden en 2 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7 y se reparte en pequeñas alícuotas congelándolas en una mezcla de alcohol y nieve carbónica, almacenándolos a -70° C. Una pequeña muestra es utilizada para determinar la cantidad de proteínas mediante el método de LOWRY y cols. (1951) previamente descrito.

b) Unión del DNA a vesículas membranosas

La muestra de vesículas membranosas se diluye en tampón fosfato 0,1 M, pH 7 para dar una concentración de 100 µg/ml. A 0,25 ml de esta dilución se añade DNA tritiado a la concentración deseada y tampón fosfato para dar un volumen final de 0,5 ml. Se incuba la mezcla durante 30 minutos con agitación directa, mediante la colocación de imanes de 5 mm en el interior de los tubos, los cuales se disponen en un baño de agua a 30° C con agitación inferior producida por un agitador magnético Selecta modelo Agimatic. Una vez finalizada la incubación se coloca la muestra en la parte superior de un gradiente de sacarosa (disuelta en el mismo tampón) de dos pasos, 9 ml de sacarosa al 15% en la parte inferior y 6 ml de sacarosa

al 5% en la superior. Los gradientes así preparados son centrifugados en una ultracentrífuga empleando un rotor SW27 a 82500xg, durante 20 minutos, a 20° C. Una vez finalizada la centrifugación, se vuelcan los tubos para eliminar el sobrenadante, secándolos cuidadosamente por su parte interior. Finalmente, se disuelve el sedimento con SDS como se ha descrito previamente y se cuenta la radioactividad asociada a las muestras.

14. Gradientes continuos de sacarosa

En algunas experiencias de unión de DNA a protoplastos, se añadía 1 μ g/ml de DNA tritiado a una suspensión de protoplastos y se realizaba una incubación a 37° C, 350 rpm durante los tiempos indicados en los resultados. Al final de dichos tiempos, se añadía EDTA a una concentración final de 40 mM, pH 7.6, centrifugando inmediatamente las muestras a 7800xg durante 10 minutos a 4° C, en un rotor JA20 y se guardaban los sobrenadantes en frío.

a) Gradientes neutros

Los gradientes continuos del 5-20% (4,2 ml) se preparaban según el método descrito por SETO y TOMASZ (1974). La sacarosa se disolvía en cloruro sódico 1 M y en el fondo de los tubos se colocaba un cojín de 0,8 ml empleando sacarosa al 60%. Una vez preformados los gradientes se colocaban 0,15 ml de los sobrenadantes en la parte superior y se centrifugaban a 45000xg, durante 105 minutos en un rotor SW50.1. Una vez finalizada la centrifugación se recogían las fracciones (de 15 gotas cada una) por punción de la parte inferior de los tubos y se procedía a contar la radioactividad presente en cada fracción.

b) Gradientes alcalinos

Estos gradientes se han realizado empleando el método de DUBNAU y DAVIDOFF-ABELSON (1971). Los gradientes contienen sacarosa del 5-20% (4,2 ml) disuelta en cloruro sódico 1 M y en sosa 0,2 N, sarcosil al 0,5% y EDTA 20 mM.

Las muestras se preparaban adicionando 0,015 ml de sosa 1 N a 0,15 ml de la muestra y se colocaban en la parte superior del gradiente que llevaba un cojín de 0,8 ml de sacarosa al 60%.

Los gradientes se centrifugaban a 45000xg durante 40 minutos en un rotor SW50.1. Las fracciones, de 15 gotas, eran colectadas y contadas de igual forma que en los gradientes neutros.

15. Determinación de exonucleasas

Muestras de 1 ml de células procedentes de un cultivo competente eran expuestas a DNA tritiado ($1 \mu\text{g/ml}$) incubándolas durante los tiempos indicados en los resultados a 37° C. Después de finalizada la incubación, las células se centrifugaron a 7800xg, 10 minutos, en frío empleando un rotor JA20. 0,5 ml del sobrenadante era precipitado con 0,5 ml de ácido perclórico al 6% y 0,1 ml de seroalbúmina bovina al 0,02%. Después de 30 minutos en hielo las muestras se centrifugaban durante 15 minutos a 11400xg, 4° C en un rotor JA20. Se tomaba una alícuota del sobrenadante y se contaba la radioactividad presente en ésta.

16. Técnicas de competición

a) Competición entre DNAs en células competentes

a.1) A nivel de unión. Cultivos competentes eran centrifugados y concentrados para dar 10^8 células viables/ml. Se tomaban muestras de 1 ml de dichos cultivos concentrados, a las que se adicionaba $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de DNA tritiado y distintas concentraciones del DNA competidor no marcado. Estas muestras se incubaban durante 10 minutos a 37° C con agitación (350 rpm). Después, se paraba la reacción añadiendo 1 ml de medio frío y rápidamente se centrifugaban las muestras a 4° C , $7800\times g$ durante 10 minutos en un rotor JA20. El sedimento era lavado dos veces con medio frío y finalmente lisado y contado para determinar la radioactividad.

a.2) A nivel de transformación. A muestras de 1 ml (procedentes de cultivos competentes) de la estirpe RUB 300 de B. subtilis se adicionaba $0.25\text{ }\mu\text{g/ml}$ de DNA procedente de la estirpe prototrofa OG1 y, simultáneamente, distintas concentraciones de DNAs competidores. Las muestras se incubaban durante 45 minutos a 37° C con una agitación de 350 rpm, parando la reacción con 1000 unidades/ml de DNasa e incubando 5 minutos más. Finalmente, se determinaba el número de transformantes, como se ha descrito previamente.

b) Competición entre DNAs a nivel de unión en protoplastos

Muestras de 1 ml de protoplastos procedentes de cultivos competentes se incubaban a 37° C , durante 10 minutos, con agitación (350 rpm), junto con $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ de DNA tritiado y distintas concentraciones del DNA competidor no marcado. Finalizada la incubación se adiciona 1 ml de medio frío y se centrifugan las muestras en las mismas condiciones que en las pruebas de com-

petición en células, valorando la radioactividad presente en las muestras.

c) Competición entre DNAs en vesículas membranosas

A 0,25 ml de vesículas membranosas ($50\mu\text{g}$ de proteínas/ml) se adicionaba $1\mu\text{g/ml}$ de DNA tritiado y distintas concentraciones de DNA competidor no radioactivo para dar un volumen final de 0,5 ml. La mezcla de reacción se incubaba a 30°C durante 30 minutos, con agitación mediante imanes de 5 mm colocados en el interior de los tubos, según se ha descrito previamente. Una vez finalizada la incubación se colocaban las muestras en la parte superior de un gradiente de sacarosa y se procedía como se ha indicado en las pruebas de unión de DNA a vesículas.

17. Técnicas de caza

En estas experiencias se utilizaban cultivos con 10^8 células viables/ml, adicionando $1\mu\text{g/ml}$ de DNA tritiado y procediendo a incubar la mezcla a 37°C , con agitación (350 rpm), durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadían $20\mu\text{g/ml}$ de DNA frío y se proseguía la incubación durante 10 minutos más en las mismas condiciones. A continuación, se centrifugaba el cultivo a $7800\times g$ 10 minutos, a 4°C en un rotor JA20 y el sedimento se lavaba 2 veces con medio frío. Finalmente, se procedía a lisar las células y a contar la radioactividad asociada a ellas.

R E S U L T A D O S

II. ESTUDIO DEL SISTEMA BIOLOGICO

Como hemos señalado anteriormente en el esquema experimental, nuestras investigaciones iban dirigidas especialmente hacia el estudio de las etapas tempranas implicadas en el proceso de transformación. Para ello, pretendimos poner a punto un método de estudio del sistema biológico que, por su rapidez y reproducibilidad, nos permitiera conseguir las condiciones experimentales óptimas para nuestros propósitos. Con tal fin, estudiamos comparativamente distintos métodos para desarrollar la competencia, así como el efecto de diversos cationes divalentes en este proceso.

1. Desarrollo de la competencia empleando distintos métodos.

Como primer paso para estudiar las características de la unión del DNA transformante a las células competentes, quisimos establecer las condiciones óptimas para lograr el desarrollo de la competencia.

Con este propósito, probamos tres métodos de competencia diferentes: el método de BOTT y WILSON (1967), el de JOENJE y cols. (1975) y el de YOUNG y WILSON (1972).

En las experiencias realizadas según el método de BOTT y WILSON (1967) empleamos la estirpe AR1 de B. subtilis. Como puede observarse en la figura 17, el máximo de competencia, determinado por transformación, con DNA procedente de la estirpe OG1 de B. subtilis, aparecía 2,5 horas después de que las células hubieran abandonado la fase exponencial de crecimiento (T_0), análogamente a lo observado por BOTT y WILSON (1967).

La aparición de este máximo de competencia es muy constante, si bien los niveles de transformabilidad alcanzados varían de unas experiencias a otras.

El método de JOENJE y cols. (1975) lo hemos desarrollado empleando la estirpe 1G20 y DNA transformante procedente de la estirpe OG1 de B. subtilis. Este método permite alcanzar el máximo de competencia aproximadamente entre 6 y 7 horas después de realizar la dilución del cultivo en medio BWC. Es, por tanto, un sistema rápido, pero presenta el inconveniente de no ser muy reproducible, ya que se observa un desplazamiento de los niveles de transformabilidad de unas experiencias a otras. En la figura 18 se muestran dos curvas de competencia obtenidas siguiendo este método. Como puede apreciarse, se observan varios picos de competencia y la amplitud de los distintos máximos, así como el momento de su aparición, difieren de una experiencia a otra, aunque las condiciones de cultivo fueron idénticas.

Finalmente, probamos el método de YOUNG y WILSON (1972) utilizando la estirpe RUB300 como receptora y el DNA procedente de la estirpe OG1 como donador. Seleccionábamos los transforman-

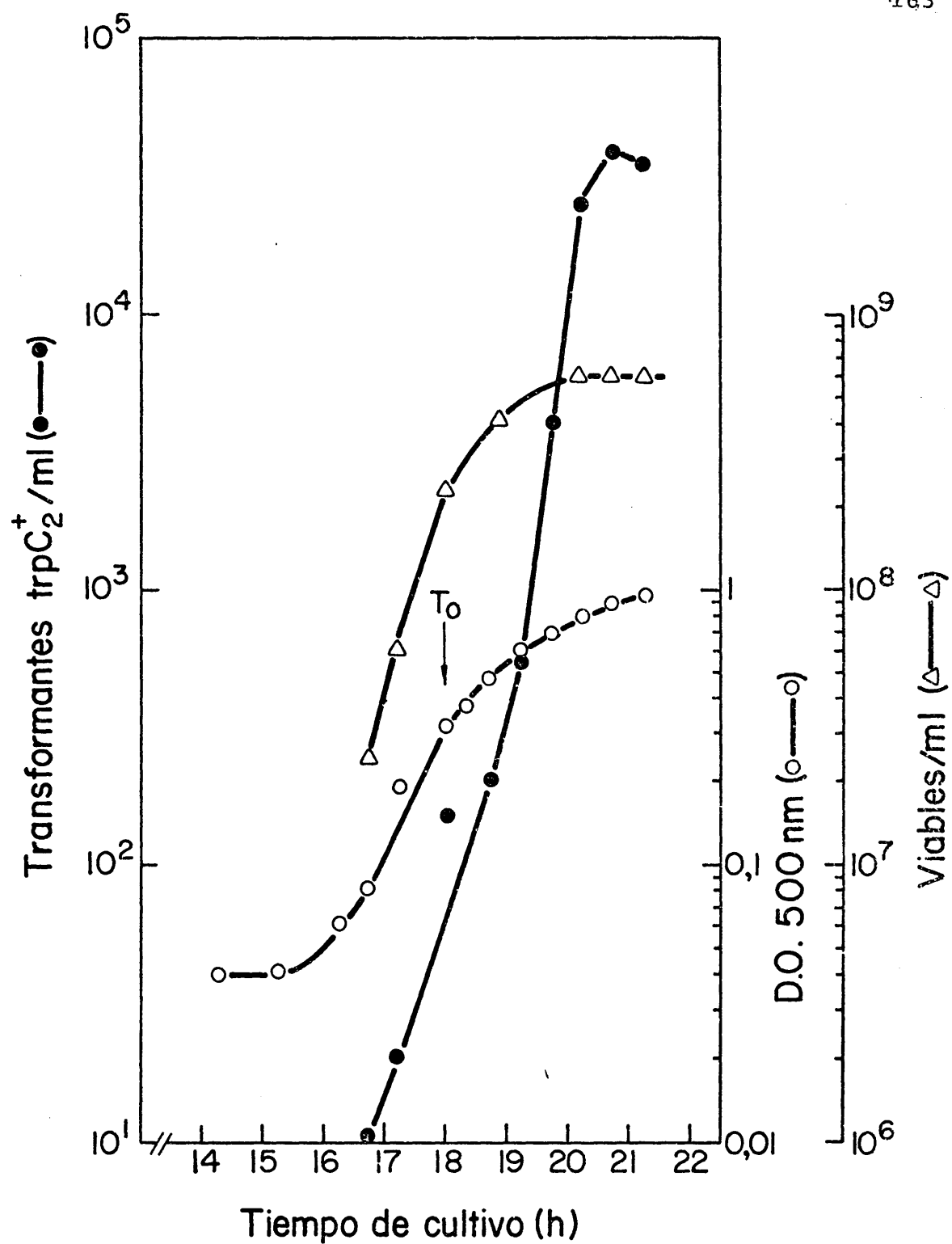


Fig. 17.- Desarrollo de la competencia de la estirpe *B. subtilis* ARI según el método de BOTT y WILSON (1967). Curva de crecimiento (○), células viables (Δ) y transformantes (●).

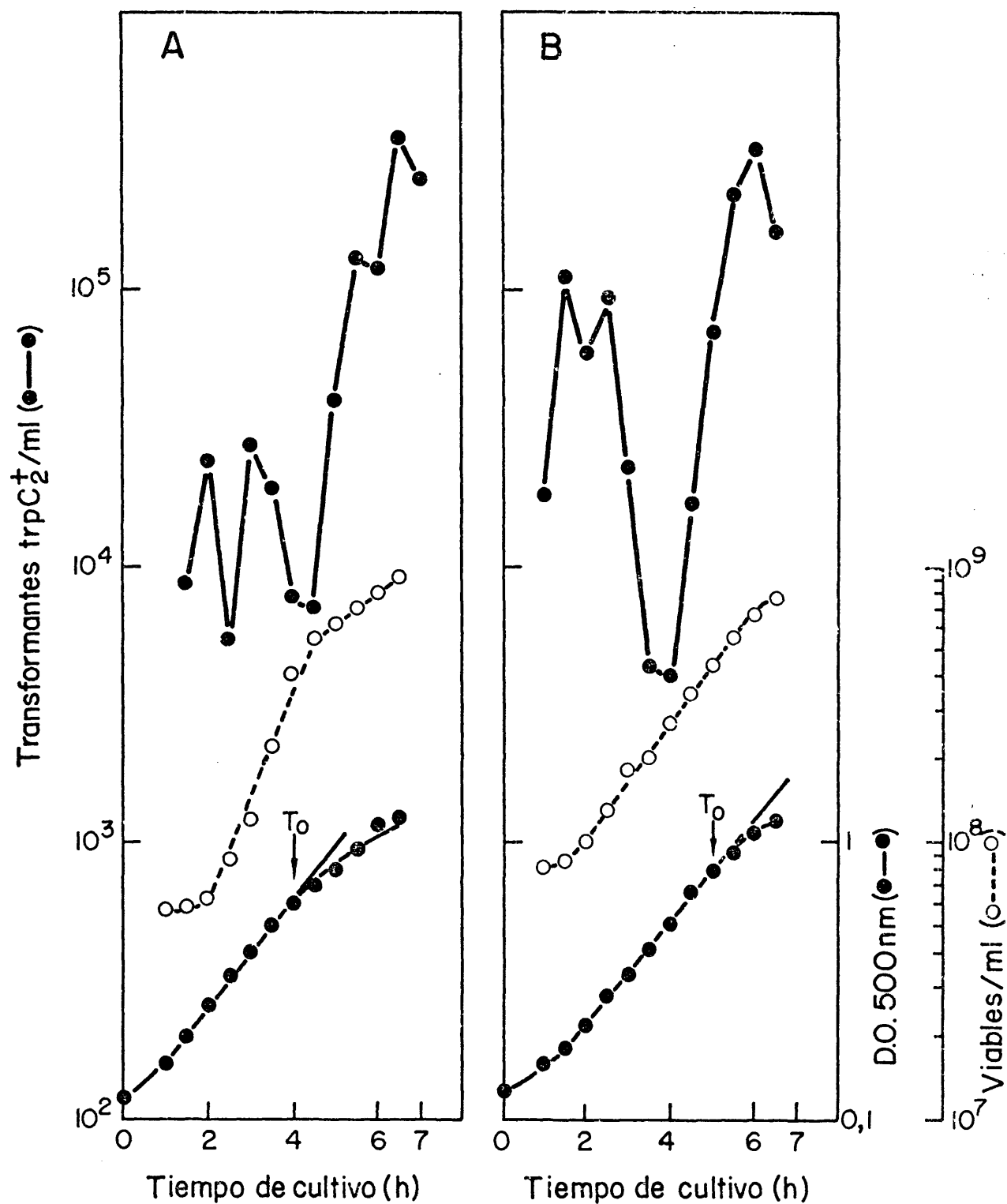


Fig. 18.- Desarrollo de la competencia de la estirpe *B. subtilis* 1G20 según el método de JOENJE y cols. (1975). (●): D.O.500 (parte inferior); (○): viables/ml y (●): transformantes trpC_2^+ /ml (parte superior).

tes en placas MM suplementadas con histidina y lisina, en las cuales solamente crecían los transformantes que habían adquirido el carácter metionina (met⁺). Se empleó la selección para met⁺ ya que la transformación para este carácter presentaba mayores frecuencias de transformación que para los otros requerimientos auxotróficos de la cepa (histidina y lisina). El máximo de competencia aparecía 1 hora después de haber realizado la dilución del cultivo en medio GM2. Además, el pico de competencia era bastante ancho, ya que 3 horas después de haber realizado la dilución del cultivo, el número de transformantes totales se mantenía en unos niveles muy similares (Fig. 19). No obstante si referimos el número de transformantes al de viables, encontramos que la máxima frecuencia de transformación aparece 1 hora después de la dilución. Este máximo de competencia presentaba unos niveles de transformabilidad superiores a los detectados con los otros dos métodos indicados previamente.

Por otra parte, este método permite preparar grandes volúmenes de cultivo competente de una sola vez, que pueden guardarse congelados a -70° C y sólo es necesario incubar una hora después de la descongelación para obtener el máximo de competencia. Este hecho permite conseguir gran reproducibilidad entre los distintos experimentos, ya que las células proceden del mismo lote congelado.

Las ventajas que presentaba este método, nos decidieron a utilizarlo de forma sistemática en nuestras experiencias posteriores.

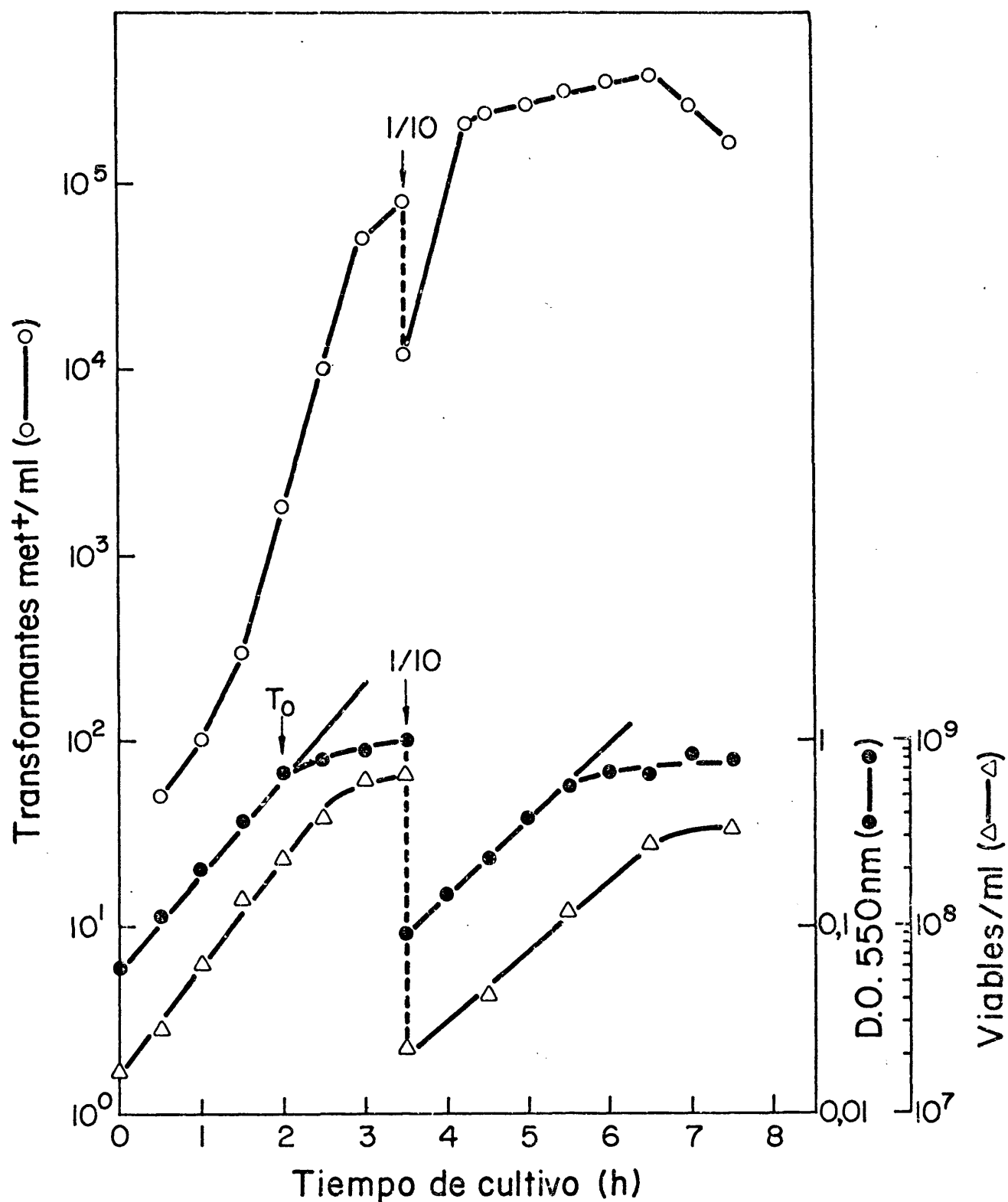


Fig. 19.- Desarrollo de la competencia de la estirpe *B. subtilis* RUB 300 según YOUNG y WILSON (1972). (●): D.O. 550; (Δ): viables/ml y (○): transformantes met^+ /ml. En el momento indicado el cultivo se diluyó 1/10 en medio GM2.

2. Modificaciones experimentales al método de competencia

Una vez elegido el método de YOUNG y WILSON (1972) como sistema para desarrollar la competencia, pensamos introducir modificaciones en dicho método, con el fin de obtener unas condiciones óptimas para nuestras necesidades experimentales.

En una primera etapa, nosotros pretendíamos estudiar el efecto de cationes divalentes sobre el proceso de la transformación. Para ello, efectuamos un estudio comparativo del desarrollo de la competencia después de la dilución 1/10 que se efectúa en el método tradicional de YOUNG y WILSON (1972), empleando dos medios: GM1 y BWC, con distintas variantes.

Como puede verse en la figura 20, comparamos los niveles de transformación obtenidos por dilución de los cultivos y posterior incubación de ellos durante una hora en distintos medios.

Los niveles finales de transformación alcanzados empleando el medio GM1 con magnesio (3,3 mM de concentración final) eran iguales a los obtenidos en el medio GM2, y superiores a los detectados utilizando el medio GM1 suplementado solamente con calcio (0,5 mM de concentración final), sin magnesio. Sin embargo, el desarrollo de la competencia en ausencia de los dos cationes aparecía considerablemente inhibido.

Por otra parte, probamos en la misma experiencia (Fig. 20), el desarrollo de la competencia en el medio BWC, ya que este medio es más simple, al no llevar en su composición ni extrac-

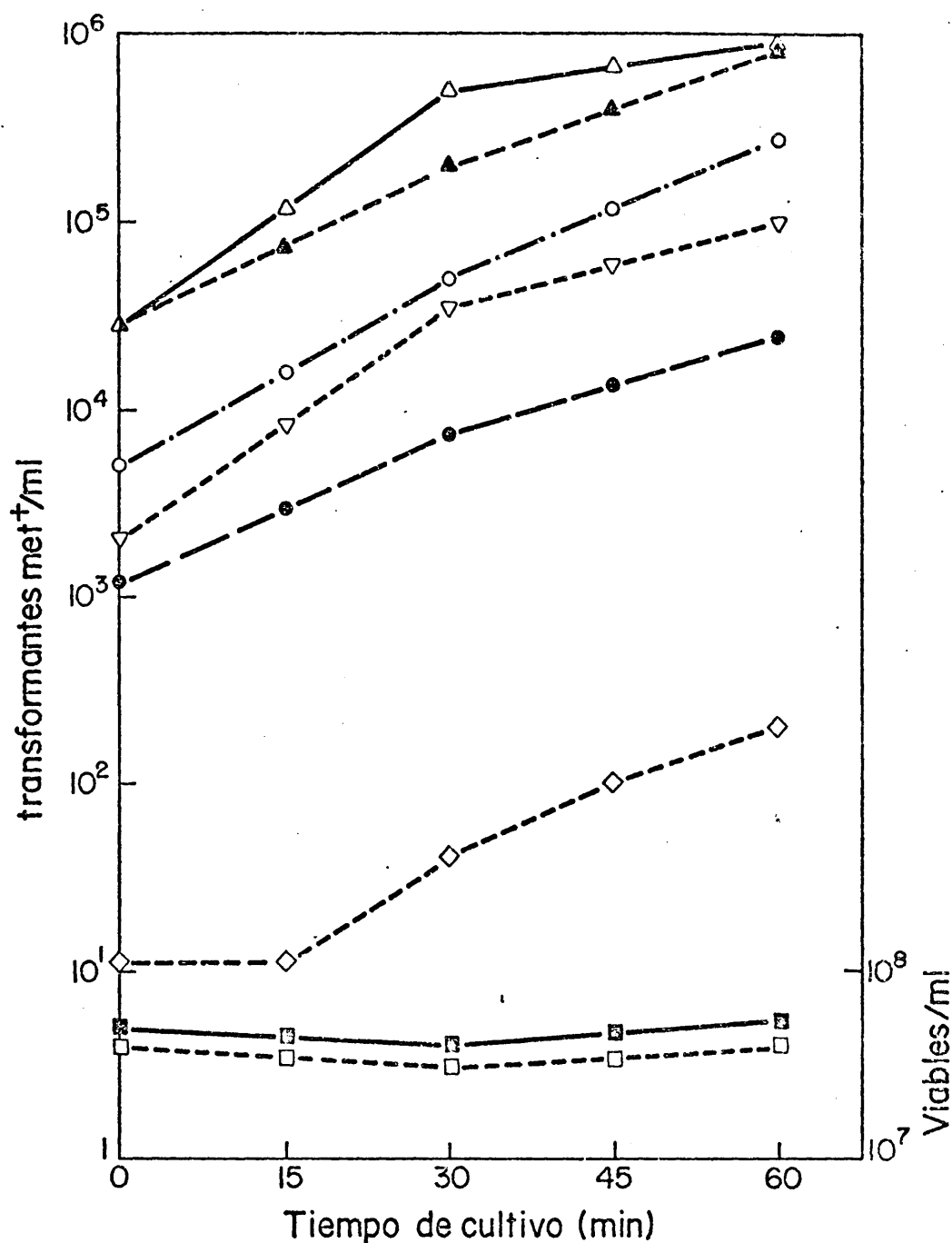


Fig. 20.- Desarrollo de la competencia de *B. subtilis* RUB 300. Un cultivo congelado en GM1, se descongeló rápidamente y se diluyó 1/10 en: GM2 (▲); GM1 + Mg²⁺ (3,3 mM) (Δ); GM1 + Ca²⁺ (0,5 mM) (o); GM1 - Ca²⁺- Mg²⁺ (●); BWC + Mg²⁺ (10 mM) (▽); y BWC - Mg²⁺ (◇). A los tiempos indicados, se sacaron muestras de los cultivos y se determinó el número de viabiles (parte inferior) en GM1 (■) y en BWC (□) y los niveles de transformabilidad (parte superior). El tiempo de transformación fue de 30 minutos.

to de levadura ni casaminoácidos, que pueden contener algunos inhibidores como contaminantes (WILSON y BOTT, 1968). Sin embargo, puede observarse en la figura 20 que los niveles de transformación, empleando este medio con magnesio, eran inferiores a los detectados empleando el medio GM1 suplementado con cationes, pero superiores en más de dos unidades logarítmicas a los valores obtenidos en medio BWC en el que se había suprimido el magnesio. En todos los medios empleados no se detectaron variaciones apreciables de viabilidad celular (Fig. 20).

Estos hechos nos llevaron a modificar el método de YOUNG y WILSON (1972), sustituyendo el medio GM2 por el medio GM1 en el momento de realizar la dilución y, en algunos casos, por el medio BWC, cuando nos interesaba estudiar comparativamente algún fenómeno en un medio más simple.

III. ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE DNA HOMOLOGO Y CELULAS COMPETENTES

Una vez establecidas las condiciones que consideramos más adecuadas para desarrollar nuestro trabajo experimental, creimos de interés el estudiar el efecto de diversos cationes en el desarrollo de la competencia. Asimismo, investigamos el papel del magnesio en las distintas etapas del proceso de transformación.

1. Efecto de cationes divalentes en el desarrollo de la competencia.

En primer lugar quisimos estudiar el efecto de diferentes cationes divalentes en el desarrollo de la competencia. Para ello, células recién descongeladas fueron resuspendidas en medio GM1 suplementado con distintos cationes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+}) empleando las concentraciones indicadas en el Cuadro IV y, como control, una muestra que no contenía cationes. Después, se incubaron las muestras durante 60 minutos y se probaron los niveles de transformabilidad, así como el número de viables, lo que nos permitió calcular las frecuencias de transformación.

Como puede observarse en el Cuadro IV, sólo el magnesio presentaba un claro efecto estimulante sobre la frecuencia de transformación, cuando se comparaba con los niveles detectados en el control. En las experiencias realizadas en presencia de calcio, los niveles obtenidos eran superiores a los de la muestra sin cationes, pero no se observó una estimulación comparable a la producida empleando magnesio. Los otros cationes probados no tenían ningún efecto apreciable sobre los niveles de transformación. El cobalto, a una concentración 1 mM, tenía un efecto tóxico, produciendo una disminución de la viabilidad, mientras que el resto de los cationes no provocaban un aumento de la mortalidad celular e incluso en algunos casos, el número de viables era mayor que en el control.

2. Papel del calcio en la transformación de *B. subtilis*

En el sistema de *S. pneumoniae*, el calcio es un catión indispensable para que se produzca la unión del DNA exógeno a las células competentes (SETO y TOMASZ, 1976). Ya que en el sistema de *B. subtilis* habíamos observado que dicho catión no producía una estimulación apreciable de los niveles de competencia (Cuadro IV), pensamos que este catión podría provocar un efecto estabilizador sobre la transformación. Para comprobar esta hipótesis realizamos un estudio comparativo, acerca del efecto del calcio sobre el desarrollo de la competencia, empleando dos métodos el de YOUNG y WILSON (1972) modificado por nosotros (dilución 1/10 en medio BWC) y el de JOENJE y cols. (1975). Puesto que este último procedimiento presenta varios máximos de transformabilidad, pensamos que el calcio podría atenuar las oscilaciones en la competencia.

CUADRO IV. Acción de diversos cationes divalentes en el proceso de transformación

Cationes	Concentración (mM)	Viables(células/ml)	Transformantes(net ⁺ /ml)	Frecuencia de transformación (*)
Control (sin cationes)	--	1,6 x 10 ⁷	4 x 10 ²	2,5 x 10 ⁻³
Mg ²⁺	3,3	3,9 x 10 ⁷	5,5 x 10 ⁵	1,4
Mn ²⁺	10 ⁻³	3 x 10 ⁷	4,7 x 10 ²	1,6 x 10 ⁻³
Mn ²⁺	1	3 x 10 ⁷	0	--
Ca ²⁺	0,5	3,7 x 10 ⁷	2 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁻²
Co ²⁺	10 ⁻³	2,4 x 10 ⁷	1,5 x 10 ³	6,2 x 10 ⁻³
Co ²⁺	1	8 x 10 ⁶	4,7 x 10 ²	5,8 x 10 ⁻³
Zn ²⁺	10 ⁻³	1,5 x 10 ⁷	5,3 x 10 ²	3,5 x 10 ⁻³
Zn ²⁺	1	2 x 10 ⁷	1,3 x 10 ³	6,5 x 10 ⁻³

(*) Frecuencia de transformación = $\frac{\text{n}^\circ \text{ transformantes/ml} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ células viables/ml}}$

Como puede observarse en la figura 21 B la presencia de calcio en el medio de cultivo provoca una inhibición de los niveles de transformabilidad y no estabiliza el desarrollo de la competencia. Por otra parte también comprobamos (Fig. 21 A) que dicho catión producía una desestabilización en los valores de las frecuencias de transformación cuando empleábamos el método de YOUNG y WILSON (1972) incluso cuando el magnesio estaba presente en el medio.

3. Efecto del etilén-diamino-tetraacetato (EDTA) en el proceso de transformación

Con el fin de investigar la unión de DNA exógeno a células competentes, sin interferencia de los procesos de incorporación en los cuales parecen estar implicados enzimas nucleolíticos dependientes del magnesio, nosotros pensamos utilizar EDTA que es un agente quelante de los cationes divalentes presentes en el medio. Este agente es un inhibidor de la transformación genética tanto en el sistema de B. subtilis (MORRISON, 1971) como en el de S. pneumoniae (SETO y TOMASZ, 1974). En ambos sistemas transformantes, el DNA unido a células tratadas con EDTA se encuentra en una forma sensible a la DNasa y además en pneumococos los niveles de unión en presencia de EDTA aparecen incrementados (SETO y TOMASZ, 1974). En primer lugar, quisimos comprobar el efecto del EDTA sobre los niveles de transformabilidad en nuestras condiciones experimentales. Para ello, un cultivo que había sido puesto en competencia era subdividido en alícuotas de 0,45 ml. A cada una de las muestras se añadía EDTA a las concentraciones indicadas en la figura 22, procediendo seguidamente a realizar experiencias de transformación como se ha indicado previamente en los métodos. En la figura 22, puede observarse que concentraciones tan bajas como 0,1 mM de EDTA reducen

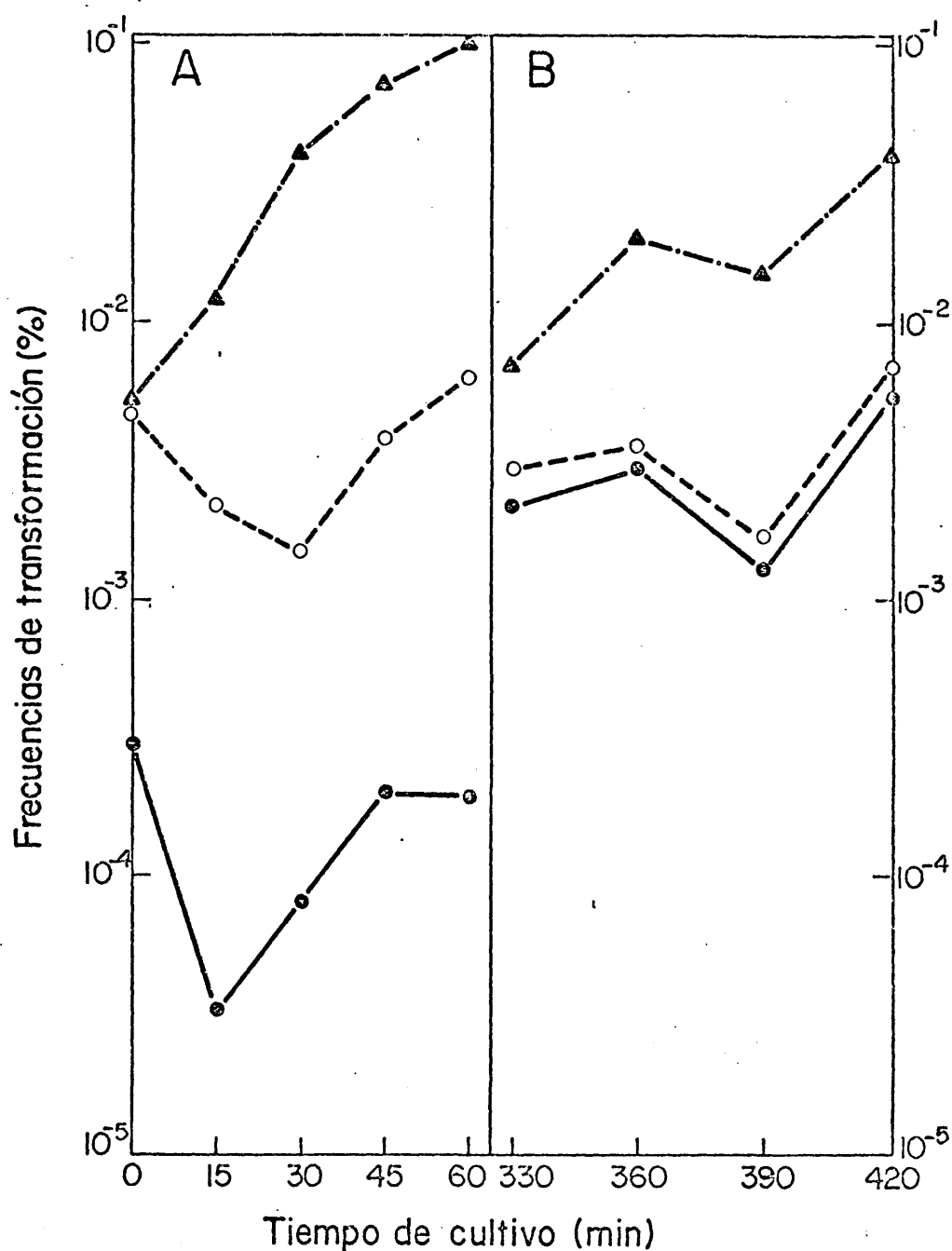


Fig. 21.- Efecto del calcio en el desarrollo de la competencia de *B. subtilis*. A.- Células de la estirpe RUB 300, en GM1 se descongelaron y resuspendieron en BWC (▲); BWC + 0,5 mM Ca²⁺ (●) y en BWC + 0,5 mM Ca²⁺ + 10 mM Mg²⁺ (○). B.- Cultivo de *B. subtilis* 1G20 puesto en competencia por el método de JOENJE y cols. (1975), en medio BWC (▲), BWC + 0,5 mM Ca²⁺ (●) y BWC + 0,5 mM Ca²⁺ + 10 mM Mg²⁺ (○).

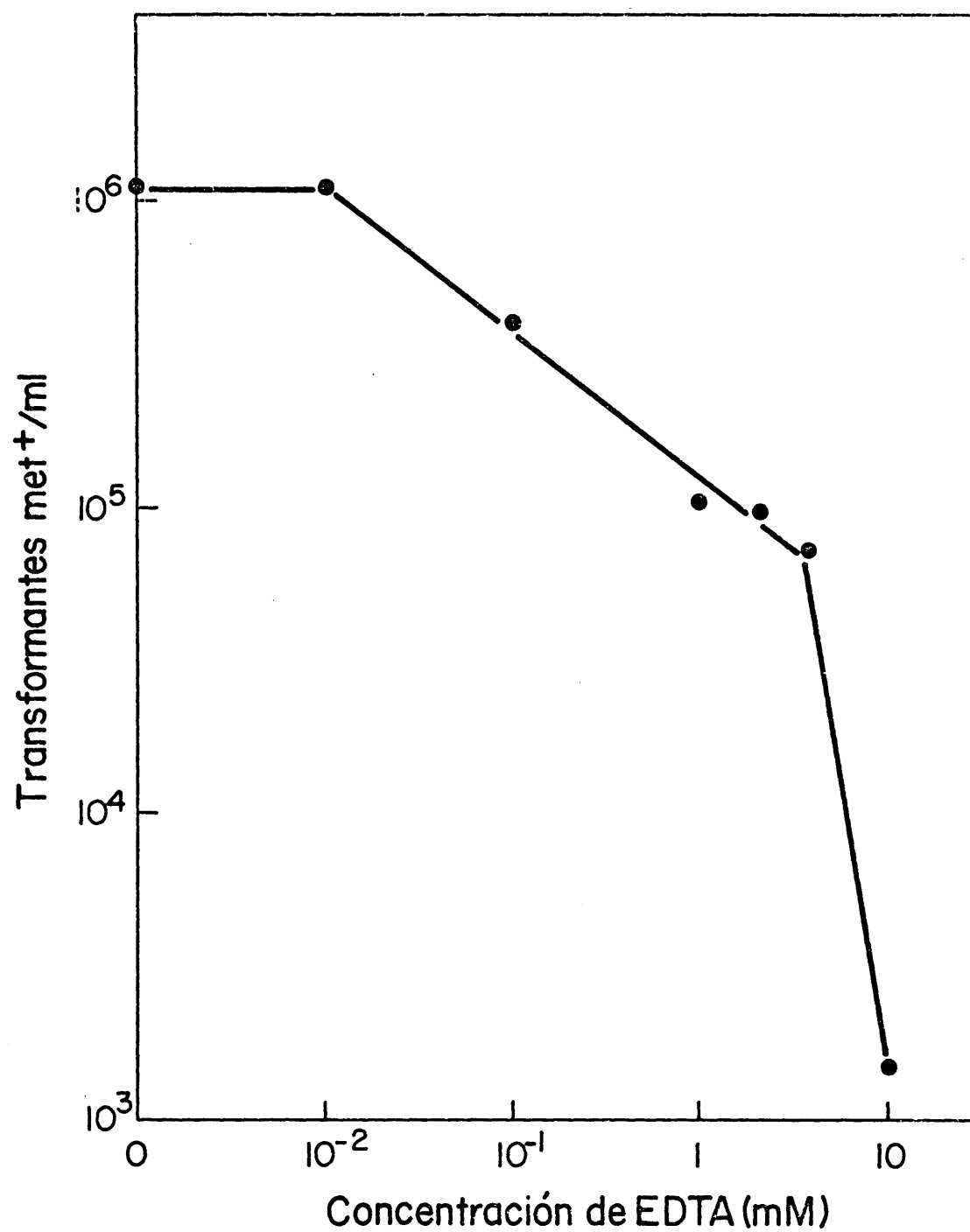


Fig. 22.- Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la transformabilidad de B. subtilis RUB 300. Cada punto es la media de tres experimentos.

la aparición de transformantes en un 50%. Cuando se empleaban concentraciones superiores a 1 mM se producía una drástica inhibición de la transformabilidad de los cultivos.

Seguidamente, estudiamos el efecto del EDTA, cuando se empleaban concentraciones fuertemente inhibitorias, en distintas condiciones experimentales (Cuadro V). El EDTA producía una gran disminución de los niveles de transformabilidad (alrededor del 95%) cuando se añadían 100 unidades/ml de DNasa I para detener la transformación (experimentos 1 y 2). El efecto inhibitorio del EDTA era más acusado (más del 99%) cuando se adicionaban 1000 unidades/ml de DNasa I (experimento 4). Por otra parte, quisimos comprobar si el efecto del EDTA sobre la transformación podía ser revertido por la adición de magnesio a cultivos tratados con dicho agente. En los experimentos 3 y 4, puede observarse que sólo se producía una recuperación parcial de los niveles de transformación (entre el 40 y el 50% del valor de los controles), cuando se añadía magnesio a cultivos preincubados con EDTA (10 mM) y se proseguía la incubación 10 minutos más antes de añadir la DNasa I. Si la concentración empleada de EDTA era de 15 mM el efecto inhibitorio producido por este compuesto era mayor y la recuperación de la transformación era sólo del 2,7%, aunque se incubara el cultivo con magnesio 45 minutos antes de añadir la DNasa I (experimento 5). Cuando la cantidad de magnesio empleado era de 100 mM se observaba un ligero decrecimiento en los niveles de recuperación de la transformación debido, probablemente, a la frecuente aparición de precipitados en estas muestras (experimentos 2 y 3). La eliminación del EDTA del medio mediante centrifugación, antes de la adición de magnesio y de DNasa, no producía variaciones aprecia-

CUADRO V.- Efecto de diferentes condiciones experimentales en la transformación

Concentración de EDTA (mM)	Concentración de magnesio (mM)	Tiempo de adición (a) de la DNasa I (min)	Frecuencias de transformación (%)	Porcentaje residual
<u>Experimento 1</u> Control: 0 5 10	10	0	0,86	100
	50	0	0,034	3,9
	50	0	0,022	2,6
<u>Experimento 2</u> Control: 0 10 10	10	0	0,083	100
	100	0	0,04	4,8
	100	10	0,33	39,7
<u>Experimento 3</u> Control: 0 10 10 10	10	0	0,84	100
	50	10	0,46	54,7
	75	10	0,46	54,7
	100	10	0,35	41,6
<u>Experimento 4</u> Control: 0 5 10 10 Control: 0 10 10	50	0	0,11	100
	50	0	0,0008	0,73
	50	0	0,00030 (b)	0,27
	50	0	0,00023 (c)	0,20
	50	10	0,13	100
	50	0	0,00030	0,23
	50	10	0,063	48,5
<u>Experimento 5</u> Control: 0 15 15	10	0	0,6	100
	50	0	0,00025	0,04
	50	45	0,016	2,7

(a) Después de la adición del magnesio, se añadía DNasa I (a una concentración de 100 unidades/ml en los primeros experimentos y de 1000 unidades/ml en los experimentos 4 y 5) a los tiempos indicados.

(b) El EDTA se eliminaba por centrifugación antes de añadir el magnesio

(c) El magnesio se añadía sin eliminar previamente el EDTA

bles en los niveles de transformación de las muestras (experimento 4).

A continuación estudiamos el efecto de diversos cationes divalentes sobre muestras que habían sido inhibidas con EDTA (10 mM). Como se observa en el Cuadro VI, la adición de calcio y manganeso no revertía el efecto del EDTA. Cuando se adicionaban magnesio y manganeso al mismo tiempo, en presencia de este segundo catión, no sólo no producía un efecto estimulante de los niveles de transformabilidad, sino que además provocaba una inhibición en los niveles de recuperación inducidos por el magnesio.

Por otra parte, quisimos estudiar el efecto del EDTA sobre la capacidad de las células para unir DNA exógeno. En esta experiencia empleamos una concentración de EDTA de 10 mM, ya que con esta concentración los niveles de transformación están fuertemente inhibidos. En el Cuadro VII aparece la unión de DNA a células competentes y no competentes, tanto en presencia como en ausencia de EDTA. La cantidad de DNA asociado a las células en presencia de EDTA variaba del 20 al 45% de los niveles del control en los cultivos competentes, mientras que no se observaba ningún efecto de este agente quelante en la unión del DNA a células no competentes.

El efecto inhibitorio del EDTA sobre la capacidad celular de unir DNA transformante, en el sistema de B. subtilis, podría ser debido a una quelación de los cationes divalentes presentes en el medio o bien a una alteración de los receptores presentes en la membrana celular. La segunda hipótesis podría

CUADRO VI.- Efecto de cationes sobre cultivos tratados con EDTA (10 mM)

Muestras	Concentración de los cationes (mM)	Frecuencias de transformación (%)	Porcentaje residual
(*) Control + Mg	10	0,6	100
Sin cationes	--	0,004	0,66
+ Ca ²⁺	5	0,0042	0,70
+ Mg ²⁺	10	0,064	10,66
+ Mn ²⁺	1	0,0036	0,60
+ Mg ²⁺ + Mn ²⁺	10 + 1	0,02	3,33

(*) El control no recibió EDTA y se adicionó el magnesio en el momento de añadir el DNA a todas las muestras.

CUADRO VII.- Efecto del EDTA (10 mM) en la unión de ^3H -DNA a cultivos competentes y no competentes(*)

	Frecuencia de transformación (%)	$\mu\text{g } ^3\text{H-DNA unido}/10^8 \text{ células}$
<u>Experimento 1</u>		
- EDTA	0,5	0,010
+ EDTA	0,005	0,0045
<u>Experimento 2</u>		
- EDTA	1,5	0,022
+ EDTA	0,04	0,044
<u>Experimento 3</u> (**)		
- EDTA	$8,2 \times 10^{-5}$	0,0007
+ EDTA	2×10^{-5}	0,0008

(*) Los cultivos se preincubaron con EDTA, o con solución salina, durante 5 minutos antes de añadir el ^3H -DNA.

(**) Los cultivos no competentes crecieron en medio TY líquido hasta el final de la fase exponencial del crecimiento.

ser cierta, ya que el EDTA provoca la liberación de varios enzimas asociados a la membrana, entre ellos NADH_2 -deshidrogenasa, málico-deshidrogenasa y ATPasa, y una destrucción parcial de la membrana en varios sistemas bacterianos (GEL'MAN y cols. 1975).

Con el fin de discernir cual de las dos posibilidades era la correcta comenzamos a estudiar detenidamente el efecto del magnesio en las distintas etapas de la transformación.

4. Papel del magnesio en la expresión, unión y penetración del DNA transformante.

Ya hemos mostrado previamente que el magnesio ejerce una acción estimulante en el desarrollo de la competencia. Debido a este hecho, quisimos estudiar el efecto de la adición de magnesio (10 mM), a distintos tiempos, a cultivos que estaban desarrollando la competencia. En esta experiencia, células recién descongeladas eran resuspendidas en medio GM1 o BWC sin magnesio y, a los tiempos indicados en la figura 23, eran tomadas alícuotas de 1 ml a las que se añadía magnesio, prosiguiendo la incubación de dichas muestras hasta una hora después del momento de la descongelación, realizando seguidamente la transformación de las muestras. Como puede observarse en la figura 23, las muestras que habían recibido el magnesio en el momento cero (60 minutos de contacto de las células con el catión), presentaban unos niveles de transformación elevados, tanto en el medio GM1 como en el BWC, y estos niveles iban disminuyendo en las muestras que habían estado menos tiempo en contacto con el magnesio. Este efecto era más acusado en el medio BWC, probablemente debido a que dicho medio es más definido que el GM1.

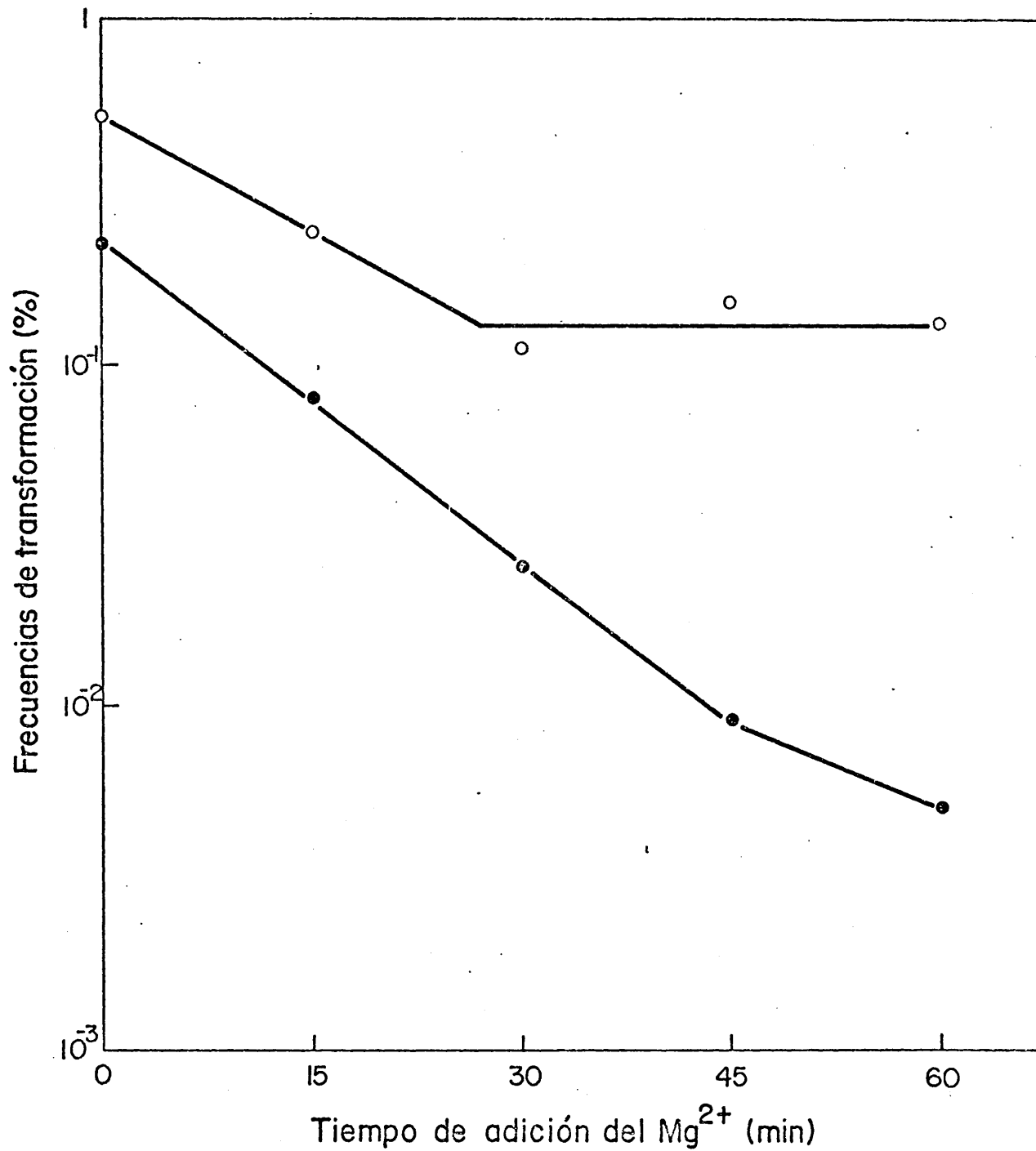


Fig. 23.- Efecto de la presencia de magnesio añadido a diferentes tiempos sobre la transformabilidad de *B. subtilis* RUB 300, incubado en medio BWC (●) y en medio GM1 (○). Cada punto es la media de dos experimentos.

Seguidamente, quisimos comprobar si células que habían sido puestas en competencia en ausencia de magnesio eran capaces de recuperar los niveles de transformabilidad normales (obtenidos en cultivos con magnesio) al adicionar este catión al medio así como la interferencia provocada por la presencia de DNA homólogo competidor (Fig. 24). Para investigar esta hipótesis, incubamos células, recién descongeladas, en medio GM1 sin magnesio durante una hora. Una vez finalizado este período de tiempo, adicionábamos al cultivo DNA transformante ($1\mu\text{g/ml}$) (curvas A y B) sólo o acompañado de DNA homólogo competidor ($10\mu\text{g/ml}$), (curva C), prosiguiendo la incubación durante 45 minutos. A los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 42,5 y 45 minutos de esta incubación se tomaban muestras de 0,5 ml a las que se adicionaba magnesio (10 mM) (curvas A y C) o magnesio más DNA competidor ($10\mu\text{g/ml}$) (curva B) de forma que todas las muestras estaban 45 minutos en contacto con el DNA, pero distintos tiempos de contacto (45, 40, 35, 30, 25, 15, 10, 5, 2,5 y 0 minutos respectivamente) con el magnesio (curvas A y C) o con este catión más el DNA competidor (curva B). Al final de los 45 minutos, se añadía DNasa I (1000 unidades/ml) y se valoraban los niveles de transformación.

En la figura 24 puede observarse que la ausencia de magnesio del medio no afecta irreversiblemente la capacidad de las células para ser transformadas, ya que sólo 10 minutos de contacto con dicho catión son suficientes para elevar la transformación hasta los niveles normales del control (curva A). Además encontramos un fenómeno de recuperación similar cuando las muestras recibían simultáneamente magnesio y DNA competidor para tiempos de contacto con el catión inferiores o iguales a 20 minutos, aunque para tiempos más prolongados de exposición al

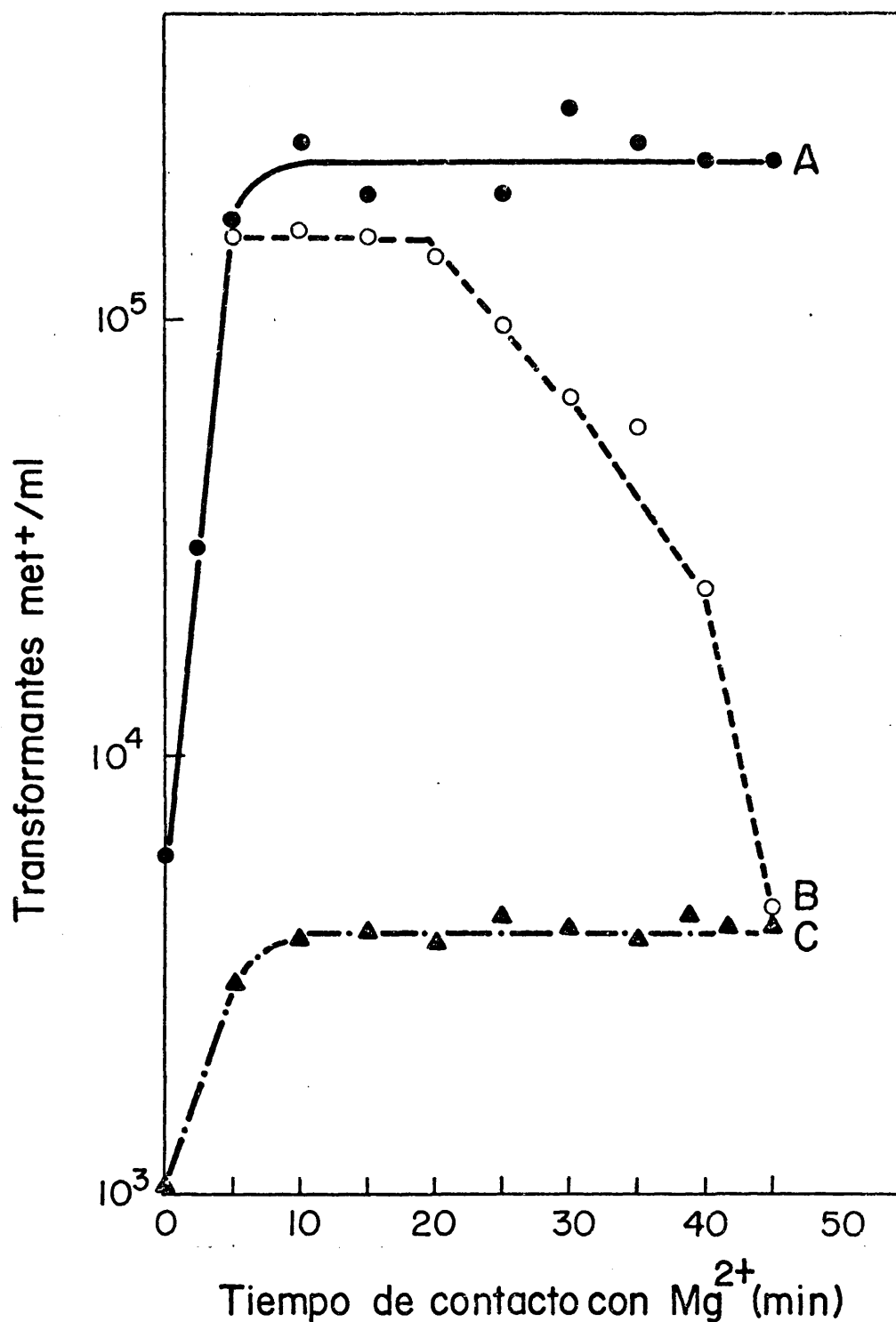


Fig. 24.- Transformabilidad de *B. subtilis* RUB 300, cultivado en GM1 sin magnesio, después de la adición de DNA homólogo competidor y/o magnesio (10 mM). Células incubadas en GM1 sin magnesio durante 60 minutos, recibieron DNA transformante ($1 \mu\text{g/ml}$) solamente (curva A y B) o DNA transformante ($1 \mu\text{g/ml}$) y DNA competidor ($10 \mu\text{g/ml}$) (Curva C). (Ver explicación en el texto).

DNA transformante (en presencia de magnesio y DNA competidor) se observaba un notable decrecimiento de los niveles de transformación (curva B). Por otra parte, cuando añadíamos DNAs transformante y competidor al mismo tiempo (curva C), sólo se detectaban niveles residuales de transformabilidad.

A continuación pasamos a estudiar la influencia de la carencia de magnesio en la capacidad celular de unir DNA exógeno. Con este motivo, investigamos el efecto de distintas concentraciones de magnesio en la unión del DNA a las células y en la transformación (Fig. 25). Los cultivos puestos en competencia según el método de YOUNG y WILSON (1972), después de ser incubados durante una hora en medio GM1 sin magnesio, eran divididos en alícuotas de 0,5 ml a las que se añadía DNA triado o frío (según se quisiera valorar unión de DNA o niveles de transformabilidad) a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ y distintas cantidades de magnesio según se indica en la figura 25. Como puede observarse, se producía una respuesta lineal a las concentraciones crecientes de magnesio en los niveles de transformación alcanzados por el cultivo. Sin embargo, la cantidad total de DNA unido por las células era independiente de las concentraciones de magnesio presentes en el medio.

Posteriormente, intentamos investigar si el DNA que había sido expuesto a células competentes, tanto en presencia como en ausencia de magnesio, sufría una pérdida de su actividad biológica. Con este fin, a cultivos que habían sido incubados durante una hora en medio GM1 sin magnesio, se adicionaba DNA transformante a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ y se proseguía la incubación durante 45 minutos. A los tiempos indicados en la fig. 26 (10, 30, 40, 42,5 y 45 minutos) se tomaban dos alícuotas

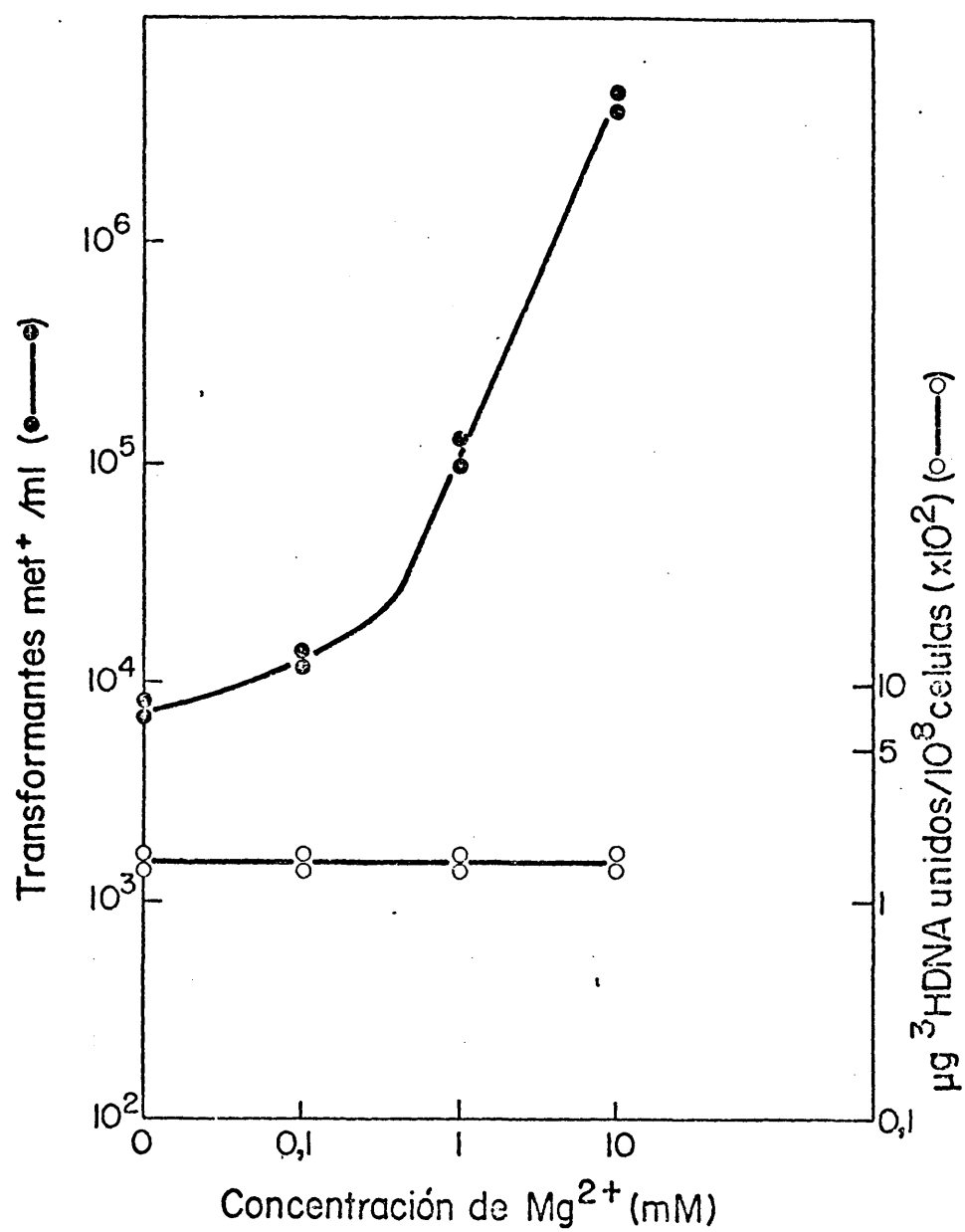


Fig. 25.- Efecto de diferentes concentraciones de magnesio en la capacidad de unión (\circ) y transformabilidad (\bullet) de *B. subtilis* RUB 300. Actividad específica 3H DNA = 95000 cpm/ μg .

del cultivo de 0,5 ml cada una. La primera alícuota recibía magnesio (10 mM) y se proseguía la incubación hasta finalizar los 45 minutos de contacto con el DNA. Después de este período de tiempo las muestras eran centrifugadas para eliminar las células (sedimento) y los sobrenadantes eran guardados en hielo hasta el momento de su uso. La otra alícuota era centrifugada para eliminar las células.

El DNA contenido en todos los sobrenadantes era utilizado como donador para transformar durante 45 minutos un segundo receptor (cultivo puesto previamente en competencia).

En la figura 26 se recogen los transformantes obtenidos en el segundo cultivo receptor. Como puede observarse, la adición de magnesio en los primeros minutos de contacto del cultivo con el DNA produce una drástica inhibición de su actividad biológica. Sin embargo, cuando el DNA estuvo en contacto con cultivos en ausencia de magnesio, incluso después de 45 minutos de exposición, sólo se apreciaba una ligera pérdida de actividad biológica que no puede considerarse significativa. Ya que el DNA expuesto a células, en presencia de magnesio, sufría una fuerte disminución de su actividad biológica, quisimos comprobar si este hecho podría ser debido a la presencia de actividad exonucleásica específica de las células competentes, descritas por JOENJE y VENEMA (1975) y que requiere magnesio para su actuación. Con este fin, valoramos la actividad exonucleásica presente en cultivos que habían desarrollado la competencia en presencia o en ausencia de magnesio.

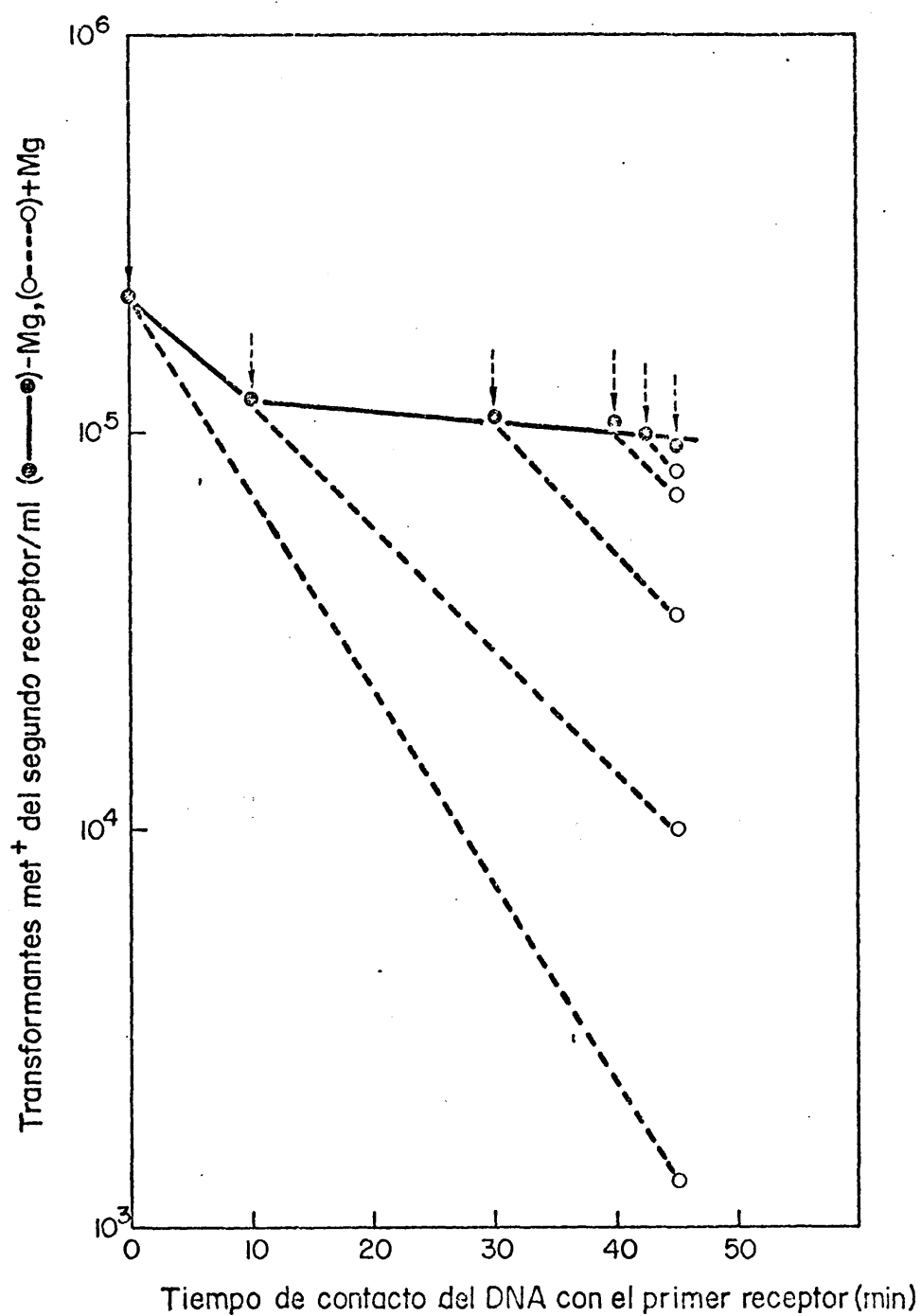


Fig. 26.- Actividad biológica del DNA presente en sobrenadantes de cultivos incubados con (o) y sin (●) magnesio (véase el texto). Cada punto es la media de dos experimentos.

En la figura 27 aparece representada la actividad exonucleásica de muestras obtenidas de cultivo realizados en medio GM1 con y sin magnesio, a los tiempos indicados. La valoración de las actividades exonucleásicas presentes en las muestras se realizó según se indica en las técnicas. Como puede observarse en la figura 27, en los cultivos realizados en presencia de magnesio se detecta una degradación elevada del DNA ya a los 20 minutos y que se hace mucho más acusada a los 60 minutos de incubación. Sin embargo, en ausencia del magnesio no se encontró actividad enzimática alguna.

Finalmente, estudiamos la cantidad total de DNA unido y de DNA que ha penetrado en el interior de las células en distintas condiciones. En el Cuadro VIII se observa que el EDTA siempre inhibía la cantidad de DNA unido, comparado con los niveles obtenidos en medio GM1 sin magnesio, lo cual indica que el EDTA altera la capacidad de las células para unir DNA exógeno. Por otra parte, en ausencia de magnesio, aproximadamente el 95% del DNA asociado a las células era eliminado por un tratamiento con DNasa I, y además esta accesibilidad es independiente del tiempo de contacto entre la célula y el DNA. Estas observaciones demuestran que, en estas condiciones, el DNA unido a las células no puede penetrar en su interior. Sin embargo, el tratamiento con DNasa I de las muestras en las que se realizaba la unión de DNA en presencia de magnesio, producía una pérdida de sólo el 55% de los niveles de unión, después de 45 minutos de incubación, lo que demuestra que un 45% de DNA unido se había incorporado.

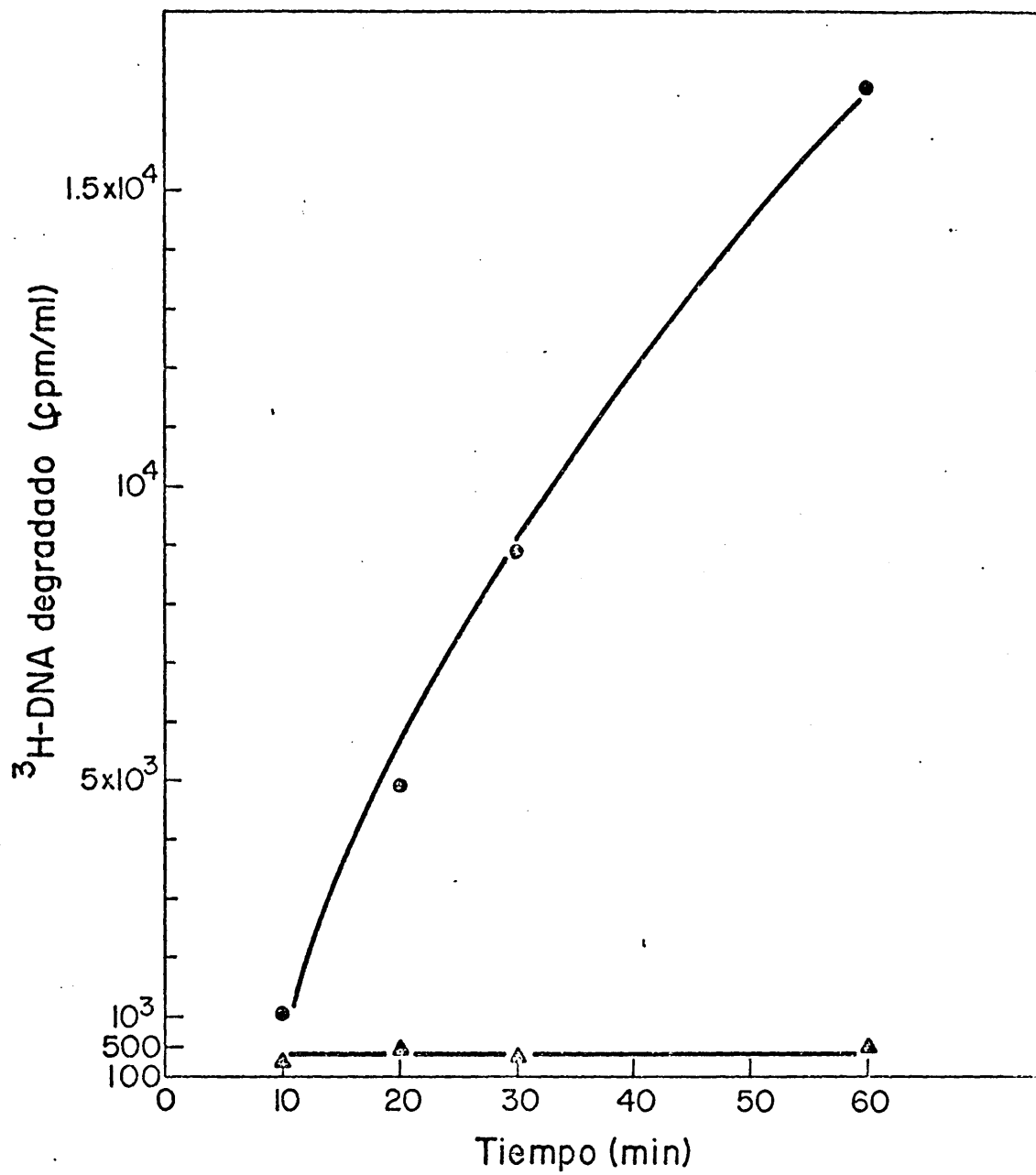


Fig. 27.- Actividad exonucleásica presente en cultivos incubados en presencia (●) o en ausencia de magnesio (▲). Cada punto es la media de dos experimentos.

CUADRO VIII.- Cinéticas de unión e incorporación de ^3H -DNA en cultivos competentes

Medios	Tiempo de exposición al DNA (min)*	Unión** ($\mu\text{g}/\text{DNA}/$ 10^8 células) ($\times 10^2$)	Incorporación** ($\mu\text{g DNA}/10^8$ células) ($\times 10^2$)	Porcentaje**
GM1 + 3,3 mM Mg^{2+}	0	0,08	-	-
	10	1,0	0,10	10,0
	15	1,2	0,22	14,7
	30	2,0	0,82	37,3
	45	2,7	1,8	45,0
GM1 - Mg^{2+}	0	0,038	-	-
	10	1,0	0,04	4,0
	15	1,5	0,05	4,2
	30	2,2	0,045	2,2
	45	4,0	0,05	1,8
GM1 + 3,3 mM Mg^{2+} 10 mM EDTA	0	0,075	-	-
	10	0,6	0,04	6,6
	15	0,7	0,05	7,1
	30	1,3	0,045	3,5
	45	2,2	0,04	1,9

* : La unión a las células competentes se realizó como se describe en los métodos. La incorporación se determinó por adición de 1000 unidades de DNasa I a los tiempos indicados, y la incubación s. prosiguió 15 minutos más, determinando finalmente la radioactividad en las muestras.

** : Cada número es la media de 5 experimentos

*** : $\text{Porcentaje} = \frac{\text{Incorporación}}{\text{unión}} \times 100$

IV. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE DNA HOMÓLOGO Y PROTOPLASTOS

Una vez realizado un estudio de las interacciones entre DNA y células competentes en distintas condiciones experimentales, quisimos investigar la asociación entre el DNA transformante y la membrana plasmática, después de haber eliminado el obstáculo que supone la presencia de la pared celular.

1. Unión de DNA a protoplastos

En primer lugar, realizamos las experiencias indicadas en el Cuadro IX. Como puede observarse, la adición de EDTA a protoplastos 5 minutos antes de añadir el ^3H -DNA provocaba una inhibición en los niveles de unión de DNA que resultó ser similar a la inducida por dicho agente quelante en las células (75%) cuando se comparaba con el valor de los controles (células en medio GM1 con o sin magnesio). Este efecto inhibitorio sólo se producía en cultivos competentes, ya que los protoplastos preparados a partir de cultivos no competentes unían la misma cantidad de DNA tanto en presencia como en ausencia de EDTA. También en el Cuadro IX aparecen señaladas

CUADRO IX.- Unión de ^3H -DNA a células y protoplastos aislados de cultivos competentes y no competentes de B. subtilis RUB300

MUESTRAS	$\mu\text{g } ^3\text{H-DNA unido}/10^8 \text{ células}$ o células equivalentes ($\times 10^3$) (\bar{X})	Desviación estándar (σ)	Numero de experimentos (n)	Porcentaje (%) de unión residual
Células + Mg^{2+}	1,9	0,007	4	100
Células - Mg^{2+}	1,85	0,007	4	100
Células + EDTA (10mM)	0,43	0,00047	4	24
*Células \rightarrow Pp + Mg^{2+}	0,64	0,0004	4	35
Células \rightarrow Pp - Mg^{2+}	0,84	0,0002	3	50
Células \rightarrow Pp + EDTA (10mM)	0,45	0,0003	3	24
Pp + Mg^{2+}	0,73	0,00014	3	40
Pp - Mg^{2+}	2,4	0,0002	4	130
Pp + EDTA (10 mM)	0,47	0,0014	3	26
Células no compt. + Mg^{2+}	0,07	-	1	4
Células no compt. + EDTA	0,10	-	1	5
Pp no competentes + Mg^{2+}	0,06	-	1	3
Pp no competentes + EDTA	0,09	-	1	5

* ^3H -DNA ($1 \mu\text{g/ml}$) se añadía a los cultivos y, después de 10 minutos de incubación las muestras se centrifugaban, lavaban y resuspendían en medio GM1 suplementado con sacarosa al 20%. La obtención de protoplastos (Pp) se realizaba por tratamiento con lisozima ($500 \mu\text{g/ml}$) durante 20 minutos y entonces los cultivos eran centrifugados y se determinaba la radioactividad de los sedimentos

unas pruebas de unión de ^3H -DNA a células competentes, las cuales se convirtieron posteriormente en protoplastos. La cantidad de DNA que permanecía unido en tales condiciones a estos protoplastos era del 35%, cuando se realizaba la experiencia en presencia de magnesio, y del 50% si este catión no se hallaba presente en el medio. Las diferencias observadas en los niveles de pérdida de DNA unido (65% y 50% respectivamente) en estas dos experiencias, podrían ser explicadas porque se produce liberación al medio de nucleasas, dependientes del magnesio, durante el proceso de obtención de protoplastos (JOENJE y VENEMA, 1975). La reducción de los niveles de DNA unido en presencia de magnesio podría haber sido incluso mayor si la lisozima no hubiera estado en el medio, ya que dicho enzima protege al DNA contra la degradación nucleolítica (JOENJE y VENEMA, 1975)

Las pruebas de unión de ^3H -DNA a protoplastos, en ausencia de magnesio, mostraban un incremento de los niveles de unión de DNA si se comparaban con los detectados en células. Ello nos sugirió que podía producirse un desenmascaramiento de los receptores del DNA en el proceso de obtención de protoplastos. Las diferencias en la cantidad de DNA unido por los protoplastos en ausencia de magnesio (130%) o en presencia de este catión (40%) podrían explicarse si existiera alguna actividad nucleolítica dependiente del magnesio que permaneciera asociada a los protoplastos.

2. Características del DNA expuesto a protoplastos

Con el fin de comprobar si existía alguna nucleasa dependiente del magnesio asociada a la membrana de los proto-

plastos, estudiamos las características de sedimentación del DNA que había estado en contacto con protoplastos en presencia y ausencia de magnesio. En esta experiencia, el ^3H -DNA ($1\mu\text{g/ml}$) era incubado con los protoplastos a diferentes tiempos (indicados en las figuras 28 y 29). A continuación, se tomaban muestras del cultivo (0,15 ml) y después de una centrifugación para eliminar los protoplastos, (sedimento), los sobrenadantes eran colocados sobre gradientes de sacarosa, neutros (Fig. 28) o alcalinos (Fig. 29). Dichos gradientes eran centrifugados y fraccionados como se describe en los métodos.

En la experiencia realizada con gradientes neutros (Fig. 28), puede observarse que sólo se producía una ligera degradación nucleolítica bicatenaria, después de 30 minutos de incubación en presencia de magnesio. Sin embargo, en el gradiente alcalino (Fig. 29) se observaban roturas monocatenarias con sólo 10 minutos de contacto del DNA con los protoplastos, en medio GM1 con magnesio. El DNA que había sido expuesto a los protoplastos en ausencia de este catión (a cualquier tiempo) no sufrió degradación monocatenaria, ya que bandeaba en la posición del control.

De esta forma, nuestros resultados parecían indicar la existencia de una actividad endonucleolítica que requería magnesio asociada a los protoplastos.

Seguidamente, quisimos comprobar si el DNA expuesto a protoplastos en presencia de magnesio sufría una pérdida de su actividad biológica tanto a nivel de su capacidad de unión a las células como de su actividad transformante. En este ex-

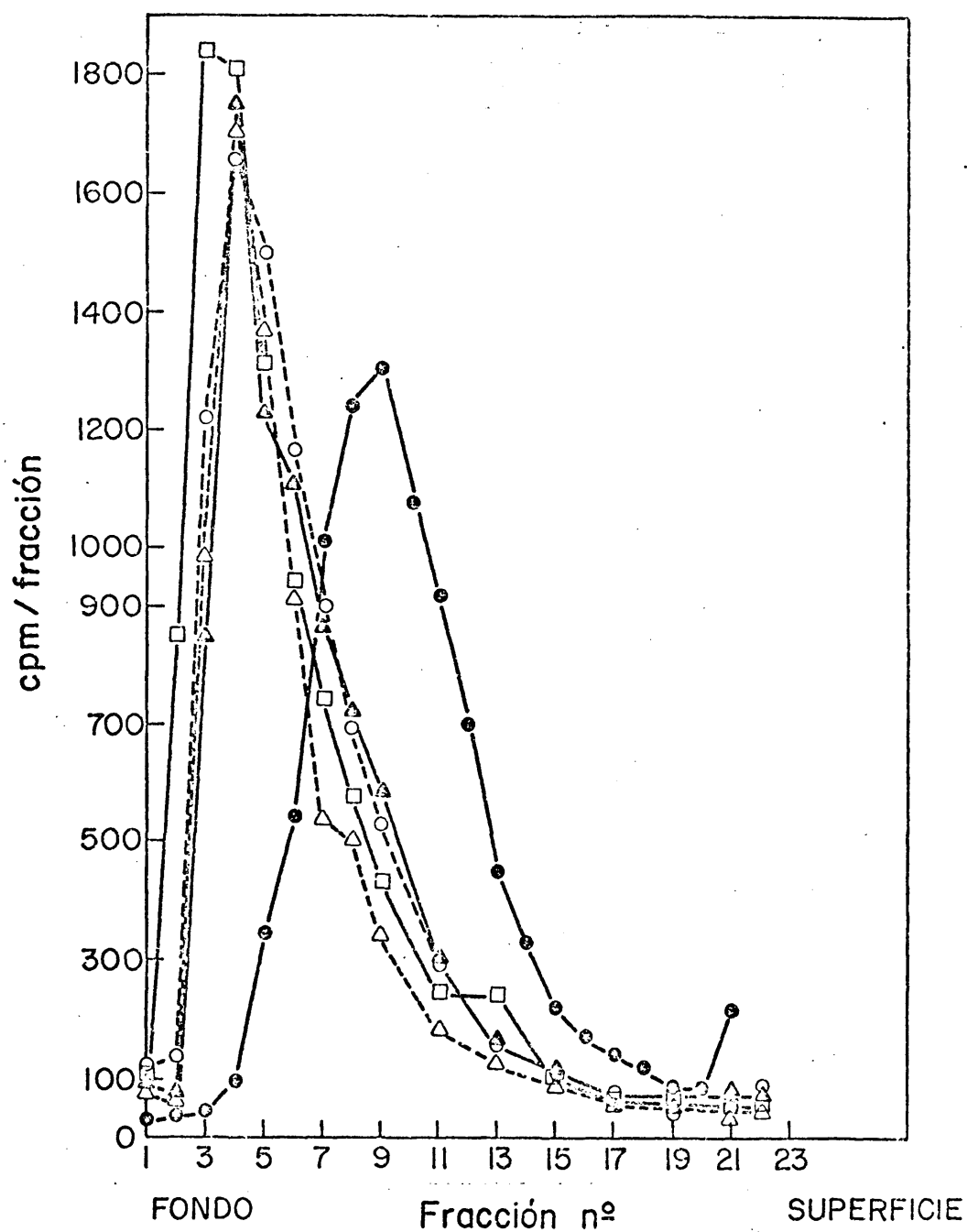


Fig. 28.- Sedimentación en gradientes neutros de sacarosa de ^3H DNA expuesto a protoplastos: en presencia de magnesio durante 15 minutos (▲) y 30 minutos (●) y en ausencia de magnesio durante 15 minutos (Δ) y 30 minutos (◻) ^3H DNA control (o).

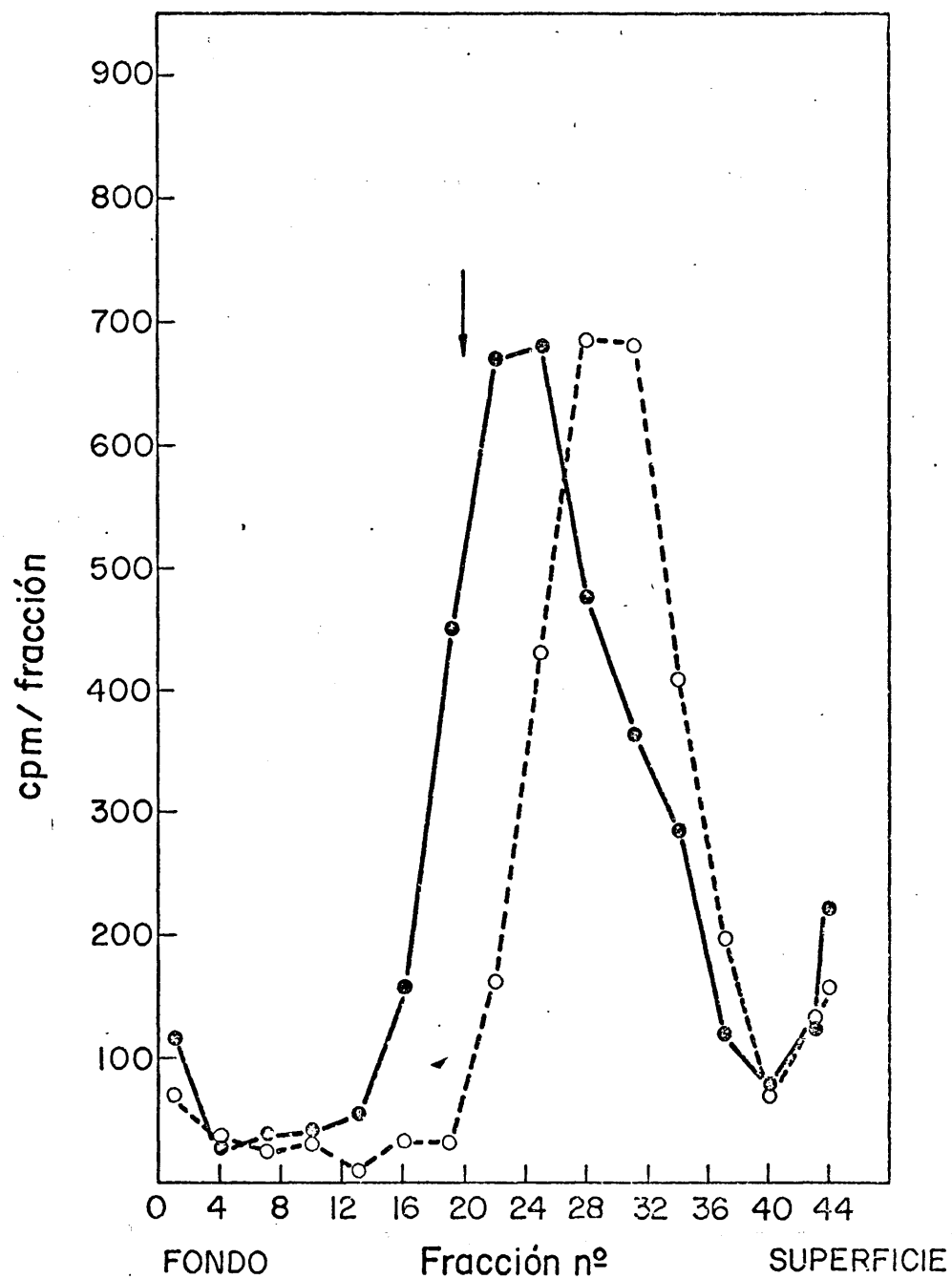


Fig. 29.- Sedimentación en gradientes alcalinos de sacarosa de ^3H DNA expuesto a protoplastos: en presencia de magnesio durante 10 (●) y 15 minutos (○). La flecha indica la posición en que bandea el DNA monocatenario control.

perimento, DNA tritiado o frío que había estado en contacto con protoplastos en presencia de magnesio durante 5, 10 y 15 minutos, era utilizado para realizar pruebas de unión y transformación, respectivamente, de un segundo cultivo receptor competente. Como puede verse en la figura 30 A, el DNA, después de 15 minutos de exposición a los protoplastos en presencia de magnesio, sufría una disminución de su capacidad de unión del 40%. Este efecto era mucho más acusado cuando se valoraba su capacidad transformante la cual quedaba reducida a un 3% aproximadamente (Fig. 30B).

3. Accesibilidad a la DNasa I del DNA unido a protoplastos

Finalmente, quisimos comprobar si el ^3H -DNA unido a protoplastos, en presencia y en ausencia de magnesio, podía ser desplazado con cantidades sobresaturantes de DNA frío o por tratamiento con DNasa I (Cuadro X). Las experiencias de incorporación de DNA y de caza fueron realizadas según se ha indicado en los métodos, empleando las concentraciones de DNasa y de DNA frío que se indican en el Cuadro X.

El DNA unido a protoplastos en un medio con y sin magnesio era eliminado casi totalmente por la DNasa (aproximadamente el 90%) y también el DNA frío era capaz de cazar alrededor del 70% del DNA unido, como puede observarse en el Cuadro X.

Ambos resultados demuestran que el DNA unido a protoplastos no ha penetrado en su interior.

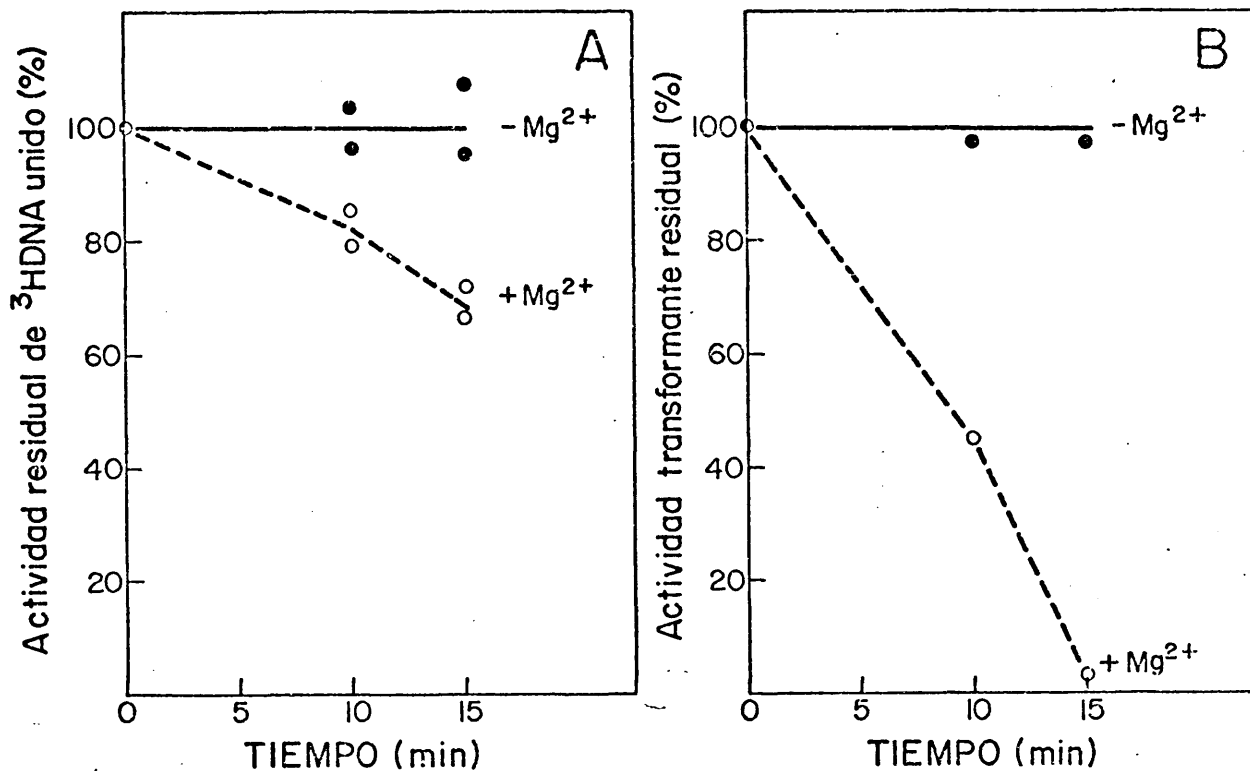


Fig. 30.- Actividad biológica residual de DNA de *B. subtilis* expuesto a protoplastos. **A**: pérdida de la capacidad de unión de ^3H -DNA después de exponerlo a protoplastos de *B. subtilis*. **B**: pérdida de la actividad transformante del DNA después de la exposición a protoplastos.

CUADRO X.- Accesibilidad a la DNasa del ^3H -DNA de B. subtilis unido a protoplastos

Muestra	cpm/ml (*)	$\mu\text{g DNA}/10^8$ células	%
Control + Mg^{2+} (**)	1827	$1,4 \times 10^{-2}$	100
+ DNasa (1000 U/ml)	290	$2,3 \times 10^{-3}$	16
+ DNA frío ($50 \mu\text{g/ml}$)	550	$4,4 \times 10^{-3}$	30
Control - Mg^{2+} (**)	2553	$2,8 \times 10^{-2}$	100
+ DNasa (1000 U/ml)	317	$3,5 \times 10^{-3}$	12
+ DNA frío ($50 \mu\text{g/ml}$)	880	$9,8 \times 10^{-3}$	34

(*) : Actividad específica ^3H -DNA = 60.000 cpm/ μg

(**) : Viabilidad: 2×10^7 u.f.c./ml

V . ESTUDIO DE LA ASOCIACION ENTRE DNA HOMOLOGO Y ESTRUCTURAS MEM- BRANOSAS.

Después de investigar las interacciones entre DNA y membranas celulares in vivo, quisimos estudiar la asociación DNA-membrana en dos sistemas in vitro: los complejos pared-membrana y las vesículas membranosas.

1. Unión de DNA a complejos pared-membrana

En primer lugar, queríamos comprobar si los receptores del DNA permanecían unidos a las membranas celulares después de someter a los cultivos competentes a una disrupción mecánica que nos condujo a la obtención de los complejos pared-membrana.

En la figura 31 aparecen recogidos los niveles de unión de DNA a los complejos pared-membrana (procedentes de células competentes) cuando se empleaban distintas concentraciones de ^3H -DNA donador, tanto en ausencia como en presencia de magnesio.

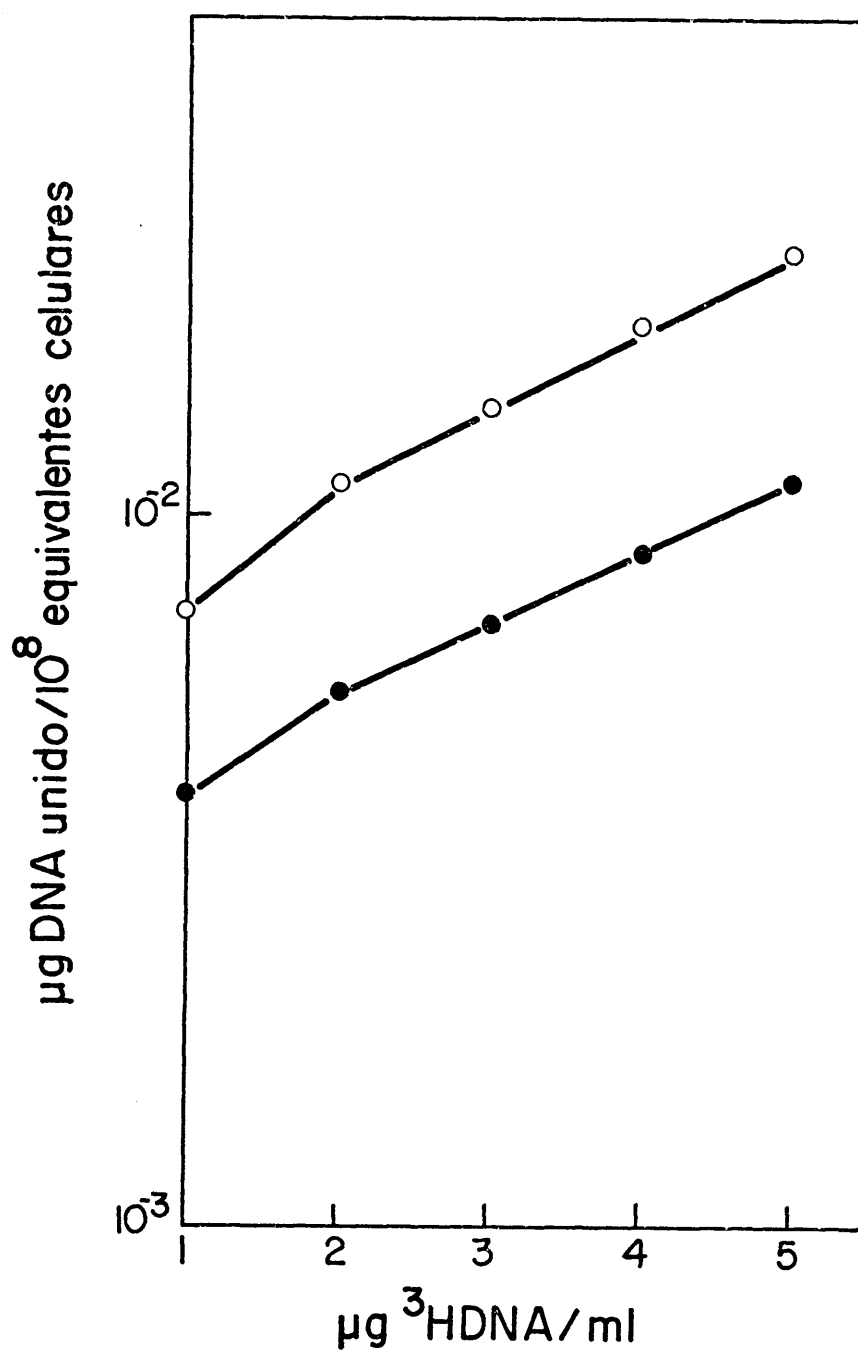


Fig. 31.- Unión de ^3H -DNA a complejos pared-membrana procedente de cultivos competentes de *B. subtilis* RUB 300, en presencia (●) o en ausencia (o) de magnesio. Cada punto es la media de dos experimentos.

Los niveles de unión en ausencia de magnesio eran superiores a los obtenidos con magnesio y comparables a los detectados empleando un número equivalente de células intactas, lo cual indica que no se han perdido los receptores.

2. Unión de DNA a paredes

Una vez establecido que los receptores del DNA permanecen asociados a los complejos pared-membrana, quisimos comprobar si las paredes aisladas de cultivos competentes, a partir de los complejos pared-membrana por tratamiento con detergente (dodecil sulfato sódico, 0,2%) durante 10 minutos para eliminar los restos de membrana, eran capaces de unir DNA exógeno.

En el cuadro XI aparecen recogidas las pruebas de unión empleando distintas condiciones experimentales.

En todos los casos estudiados (en presencia o ausencia de magnesio y de EDTA) los niveles de unión detectados eran similares a los obtenidos realizando la experiencia a 0° C (control), lo cual indica que los receptores no están situados en las paredes de las células competentes.

Este hecho nos indujo a investigar las interacciones existentes entre DNA y vesículas membranosas.

CUADRO XI.- Unión de ^3H -DNA a paredes procedentes de células competentes de B. subtilis*

Paredes	$\mu\text{g } ^3\text{H-DNA}$	Kp buffer 0,1M pH 7 (ml)	$\text{SO}_4\text{Mg } 10 \text{ mM (ml)}$	EDTA 10 mM (ml)	Frecuencias de transformación de los cultivos originales (%;	cpm/ml
** Control	1	0,9	-	-	0,073	280
+ Mg^{2+}	1	0,8	0,1	-	0,07	382
+ EDTA	1	0,8	-	0,1	0,07	360
- Mg -EDTA	1	0,9	-	-	0,073	270

✓ * Después del tratamiento con detergente las paredes se lavaron exhaustivamente con tampón fosfato 0,1 M. La unión de ^3H -DNA se realizó del mismo modo que para los complejos pared-membrana

** El control se realizó incubando las paredes con el DNA a 0°C

3.- Unión de DNA a vesículas membranosas

El estudio de la interacción entre DNA y vesículas requería en primer lugar establecer las condiciones óptimas para obtener las vesículas membranosas.

El procedimiento habitual de obtención de vesículas (JOENJE y cols, 1974) incluye un tratamiento con EDTA. Este tratamiento se realiza, según unos autores (KABACK, 1970) porque evita la presencia de RNA en concentraciones elevadas (25%) mientras que, por otra parte, ARCHER (1975) postula que el EDTA actuaría eliminando los restos de pared que pueden quedar como contaminantes de las vesículas. Nosotros quisimos comprobar si estas hipótesis eran ciertas, ya que, según hemos mostrado previamente, este agente quelante provoca una alteración de los receptores del DNA y no deseábamos emplearlo en la obtención de las vesículas, para evitar este efecto. Con este motivo, realizamos una valoración de la cantidad de RNA contenido en vesículas obtenidas en presencia y en ausencia de EDTA (según se ha descrito en los métodos), comprobando que los niveles de RNA presentes en las dos muestras era iguales (aproximadamente el 1%).

Por otra parte, quisimos comprobar la posible presencia de restos de pared en las vesículas. Con este fin, tomamos muestras de vesículas obtenidas en presencia y ausencia de EDTA y realizamos fotografías con el microscopio electrónico (Figs. 32 y 33), comprobando que no parecían existir restos apreciables de pared, ni diferencias morfológicas apreciables entre una muestra y otra de vesículas.



Fig. 32.- Microfotografía al microscopio electrónico de vesículas membranosas obtenidas en presencia de EDTA (x120.800).

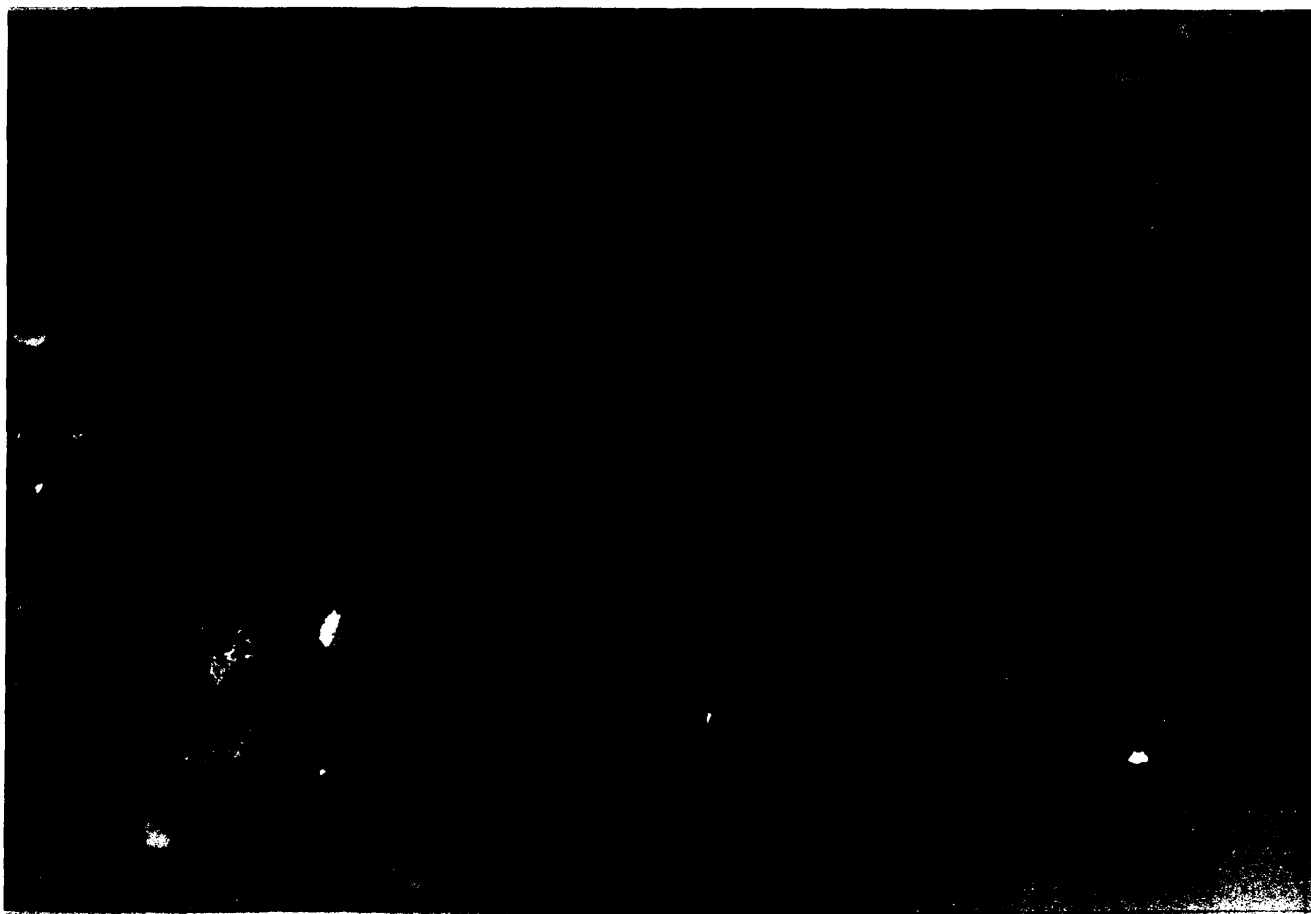


Fig. 33.- Microfotografía al microscopio electrónico de vesículas membranosas obtenidas en ausencia de EDTA (x120.800).

Estos hechos nos decidieron a eliminar el tratamiento con EDTA del proceso de aislamiento de vesículas.

Seguidamente, quisimos comprobar si el procedimiento para sedimentar los complejos DNA- membrana mediante gradientes discontinuos de sacarosa era un método adecuado o si, por el contrario, parte del DNA podría sedimentar en nuestras condiciones de centrifugación. Con esta finalidad una muestra que contenía $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de ^3H -DNA fue colocada sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (5 y 15%) y, después de ser centrifugado, como se describe en los métodos, se fraccionó por la parte superior. En la figura 34 aparece la representación gráfica de dicho fraccionamiento. Como puede observarse, la mayor parte del DNA se encontraba en las fracciones iniciales y la concentración de DNA iba disminuyendo según nos aproximábamos al fondo del tubo. Estos resultados indicaban que si el DNA no se encuentra asociado a las vesículas membranosas no sedimenta en los gradientes de sacarosa.

A continuación, quisimos encontrar la concentración de proteínas idónea para realizar las pruebas de unión de DNA a las vesículas. Para ello, determinamos la cantidad de DNA unido por distintas concentraciones de vesículas membranosas, manteniendo constante la concentración de DNA ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$). Como puede verse en la figura 35, los niveles de unión obtenidos en un rango de 5 a $500\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas/ml eran similares. Por esta razón, decidimos utilizar un valor intermedio para nuestros siguientes experimentos, eligiendo el de $50\text{ }\mu\text{g/ml}$.

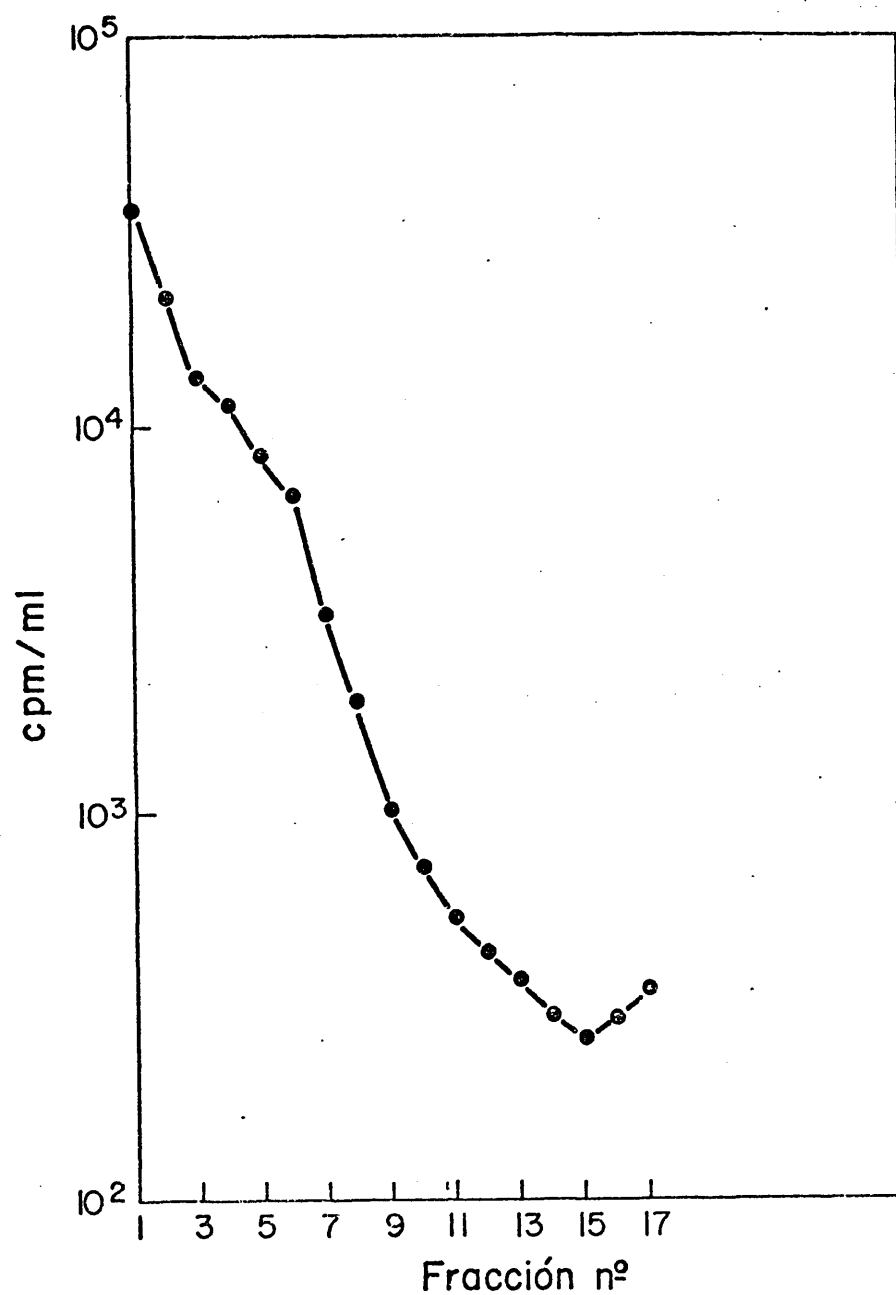


Fig. 34.- Patrón de sedimentación de una muestra de ^3H -DNA de B. subtilis sometido a centrifugación en gradientes de sacarosa en las mismas condiciones que las utilizadas para valorar la unión de DNA a vesículas membranas.

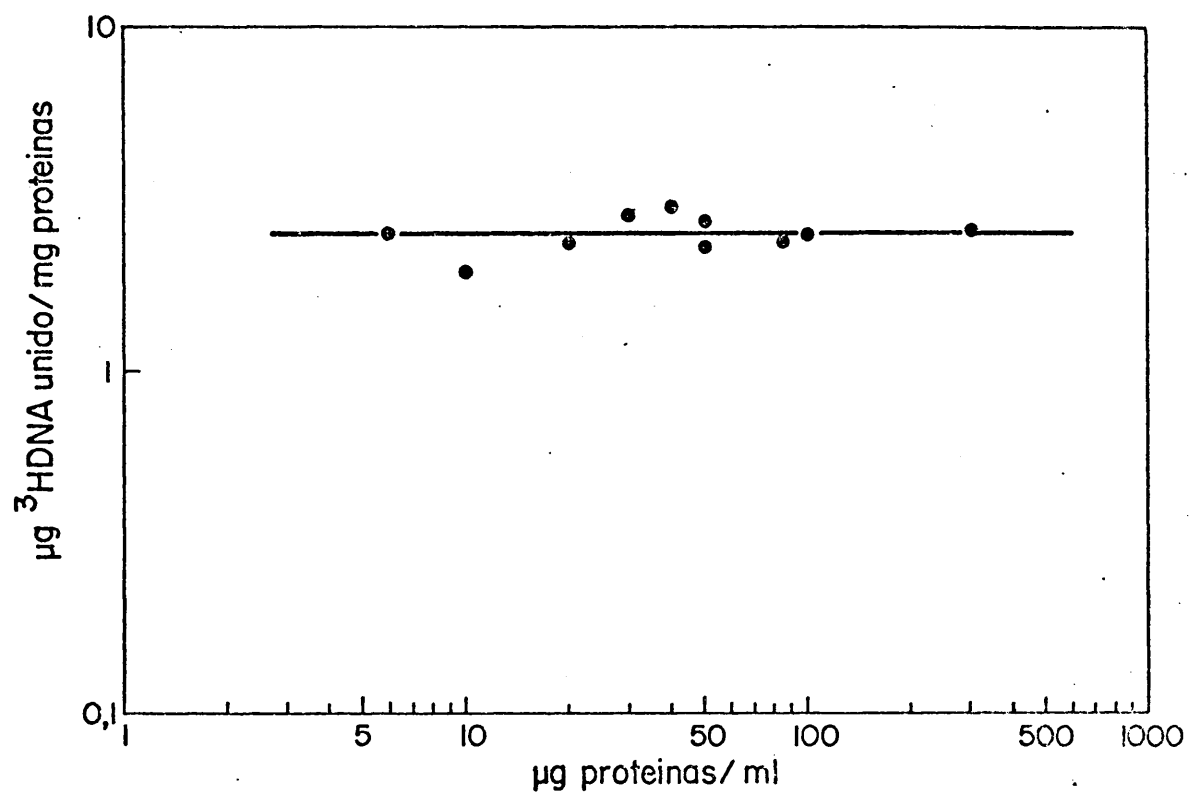


Fig. 35.- Efecto de diferentes cantidades de vesículas membranosas en la formación de los complejos DNA-membrana. Cada punto es la media de dos experimentos.

A continuación, realizamos pruebas de unión de DNA a vesículas, en presencia y ausencia de magnesio, empleando distintas concentraciones de DNA.

Los niveles de unión en ausencia de magnesio eran superiores que los obtenidos con magnesio. En los dos casos, se observaban dos niveles de saturación que podían corresponder a dos tipos de receptores con distinta afinidad por el DNA (Fig. 36). También realizamos esta experiencia en presencia de EDTA y, como puede verse en la figura 36, los niveles detectados eran similares a los obtenidos en presencia de magnesio, aunque el primer nivel de saturación aparecía desplazado. Cuando las pruebas de unión de DNA se realizaban empleando vesículas procedentes de cultivos no competentes, (Fig. 36) los niveles observados no eran significativos.

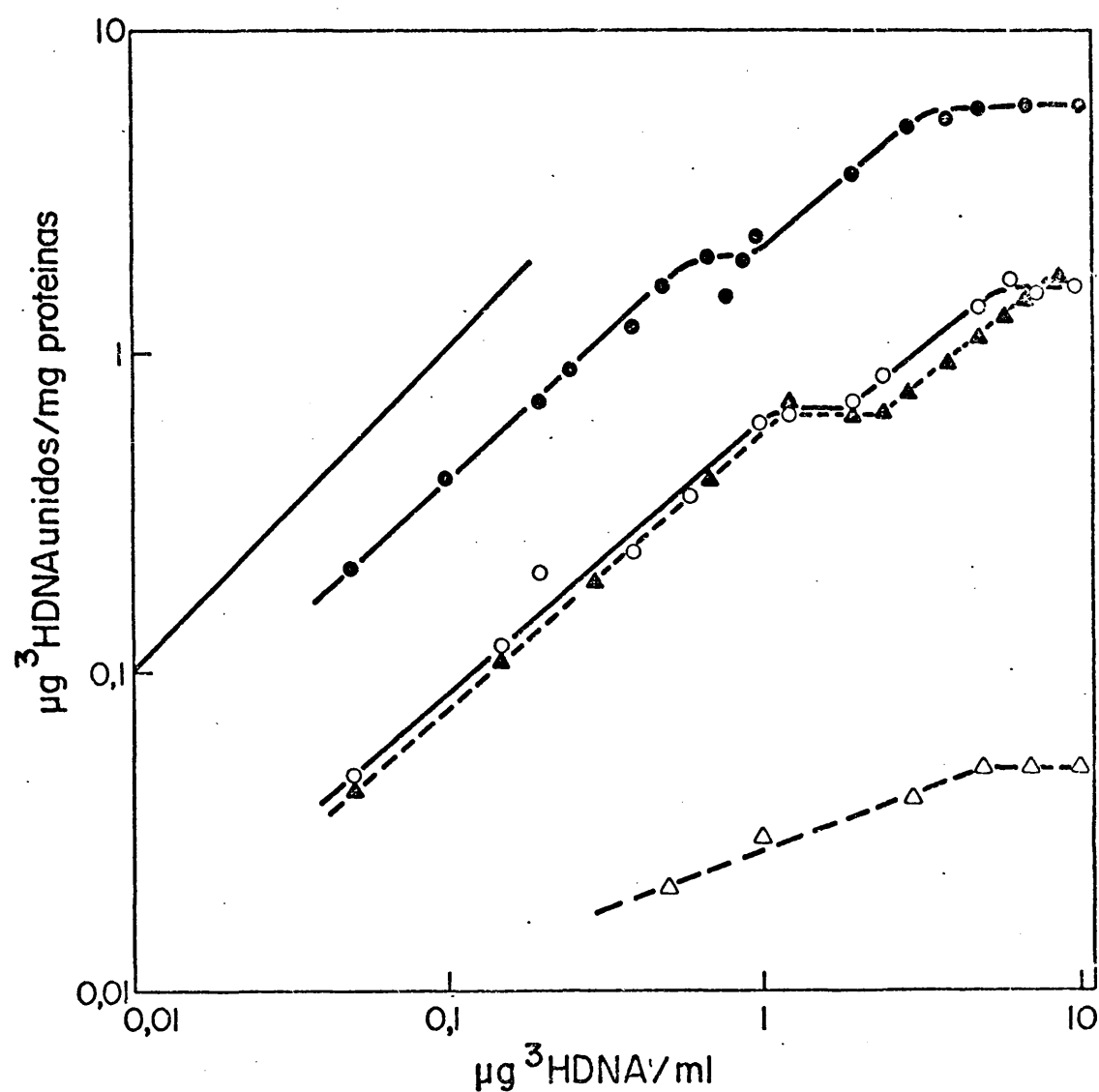


Fig. 36.- Efecto de diferentes cantidades de DNA en la formación de los complejos DNA-membrana. (●, o)=vesículas preparadas en ausencia de EDTA y unión efectuada en ausencia (●) o en presencia de magnesio (o). (▲) vesículas aisladas en tampón conteniendo EDTA (15 mM) y unión ensayada en presencia de EDTA (15 mM) (Δ) vesículas aisladas a partir de cultivo no competentes. La recta representa una respuesta de primer orden con una pendiente de 45°. Cada punto es la media de tres experimentos.

VI . INTERACCION ENTRE DNAs HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS Y LA PERIFERIA CELULAR

Los estudios descritos en los capítulos anteriores nos habían permitido conocer algunas de las características de la interacción entre DNA homólogo y estructuras membranosas en el sistema de B. subtilis tanto in vivo como in vitro.

Seguidamente, quisimos realizar un estudio comparativo de las interacciones entre DNAs homólogo y heterólogos con los receptores de DNA en células, protoplastos y vesículas membranosas.

1. Estudio de la capacidad de unión e incorporación de DNAs de distintos orígenes en células.

En primer lugar, valoramos el efecto de distintas concentraciones de ^3H -DNA de B. subtilis en la unión y penetración de dicho DNA en células competentes, así como la unión del DNA homólogo en células no competentes.

Como puede observarse en la figura 37 los niveles de unión alcanzados en células competentes eran superiores, en un orden de magnitud, a los detectados en cultivos no competentes. Además, sólo aproximadamente el 20% del DNA unido a las células competentes puede penetrar en el interior de éstas. También de esta figura puede concluirse que aparece un nivel de saturación en la cantidad de DNA unido para una concentración de DNA de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$, aproximadamente.

Seguidamente, analizamos los niveles de unión a células competentes y no competentes de DNA procedente de dos bacteriófagos de E. coli: T*4 y T4.

En la figura 38, puede comprobarse que la curva de unión de T*4 a células competentes presenta un nivel de saturación para una concentración de DNA de unos $2\text{ }\mu\text{g/ml}$. La diferencia entre la cantidad de DNA unido por células competentes y no competentes es significativa, lo cual indica que la unión de este DNA a células competentes es específica. Además, la prueba de incorporación parece indicar que la mayor parte del DNA unido a las células competentes ha penetrado en el interior de ellas.

En la figura 39 puede verse la curva de unión de DNA del fago T4 a células competentes, apareciendo la saturación alrededor de $7\text{ }\mu\text{g/ml}$ de DNA. Aparentemente, todo el DNA unido a células competentes parecía haber penetrado en su interior. La unión de ^3H -DNA de T4 a células no competentes puede ser considerada como residual.

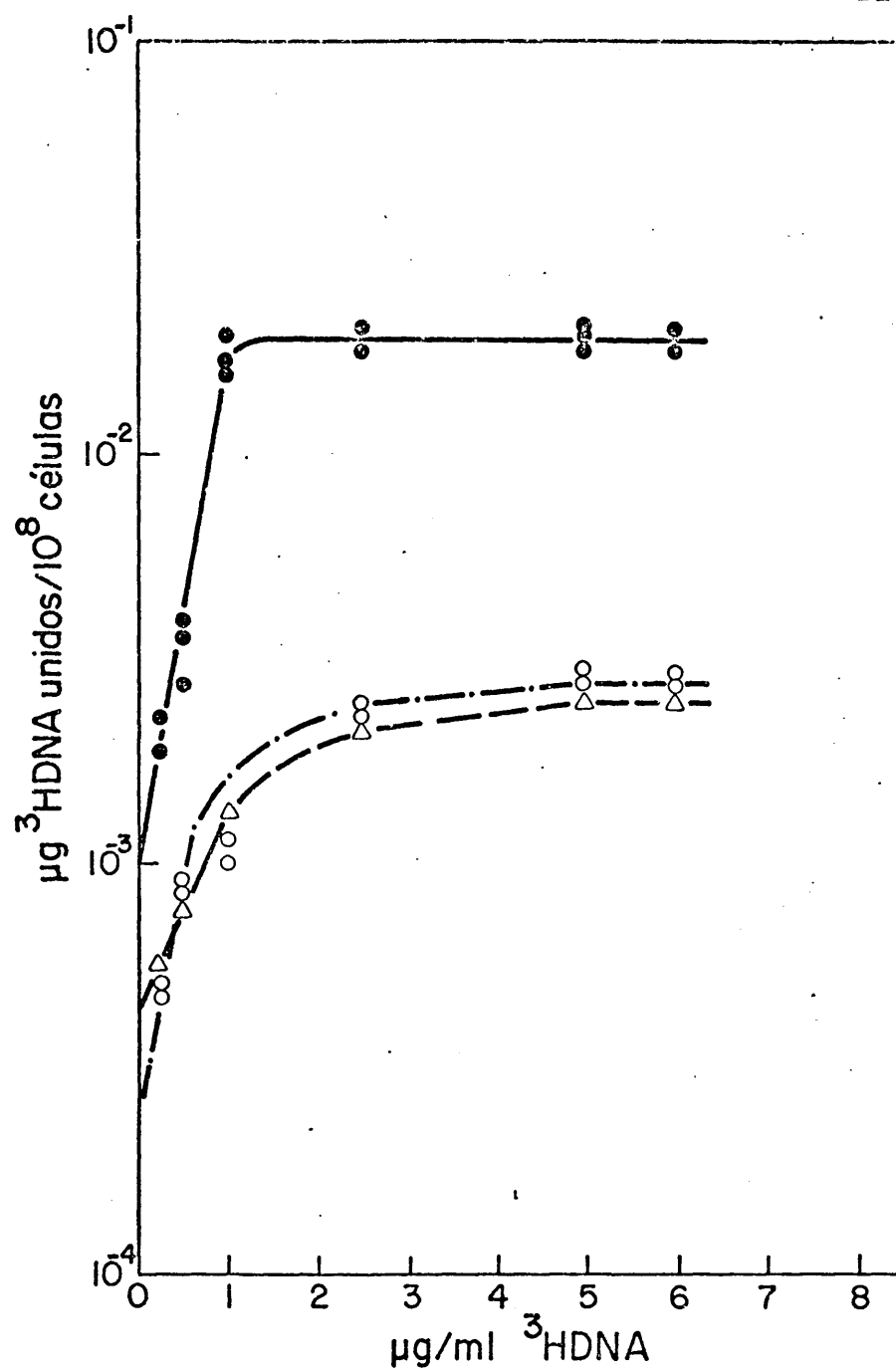


Fig. 37.- Unión e incorporación de ³H-DNA de *B. subtilis* a cultivos de *B. subtilis* RUB 300. (●) = unión a células competentes; (○) = penetración en células competentes y (Δ) = unión a células no competentes.

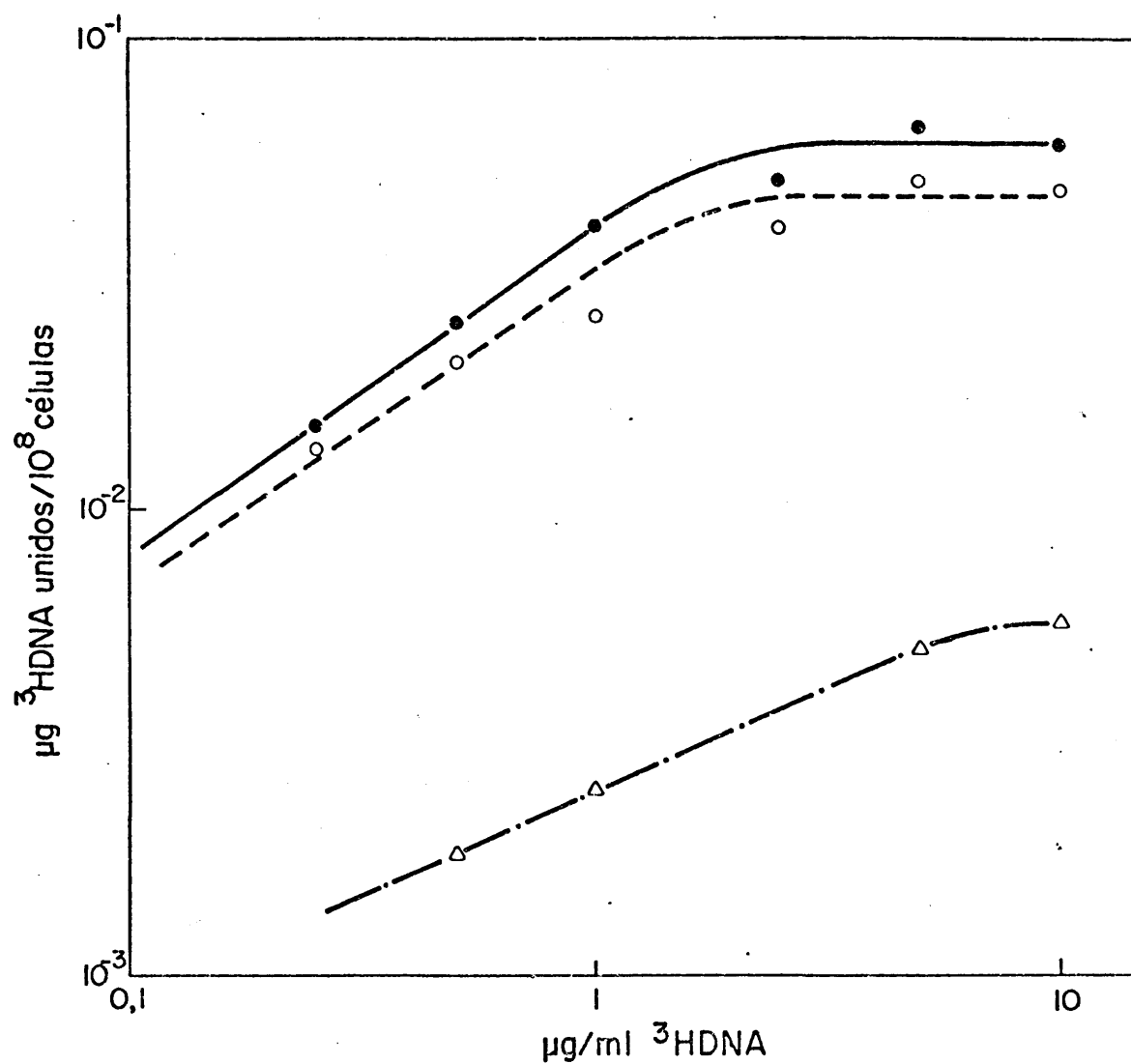


Fig. 38.- Unión e incorporación de ^3H -DNA de T*4 a cultivos de *B. subtilis* RUB 300. (●) = unión a células competentes; (○) = penetración en células competentes y (Δ) = unión a células no competentes. Cada punto es la media de tres experimentos.

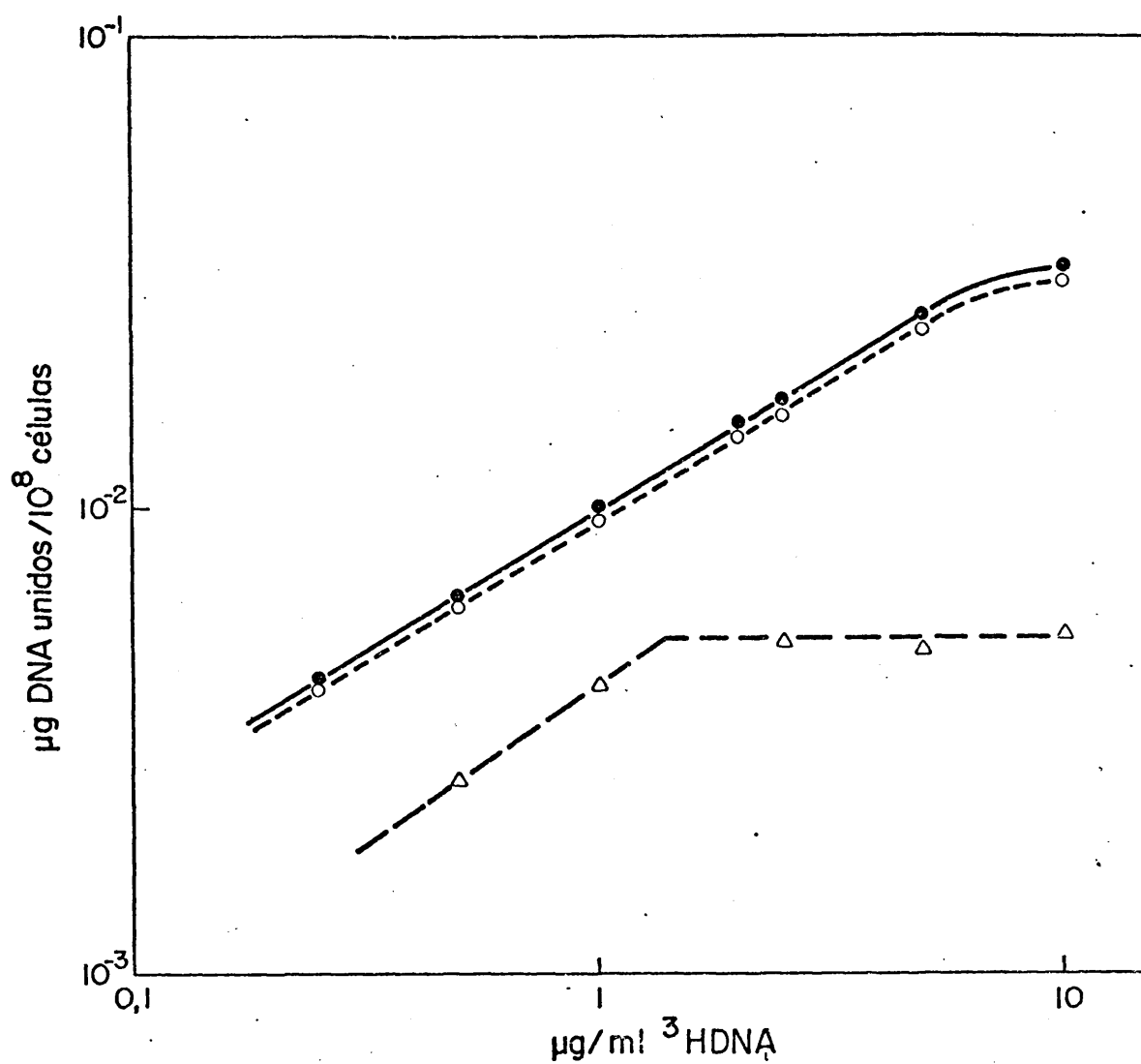


Fig. 39.- Unión e incorporación de ^3H -DNA de T4 a cultivos de *B. subtilis* RUB 300 (●) = unión a células competentes; (○) = penetración en células competentes; (Δ) = unión a células no competentes. Cada punto es la media de tres experimentos.

Las pruebas de incorporación del DNA de los fagos T4 y T*4 parecían indicar que casi todo el DNA unido a células competentes era unido irreversiblemente por ellas. Sin embargo, ha sido descrito previamente (SOLTYK y cols. 1975) que los DNAs de los fagos T-pares son poco sensibles al tratamiento con DNasa pancreática. Con el fin de comprobar el grado de sensibilidad del DNA homólogo y de los dos DNAs heterólogos al tratamiento con DNasa I, incubamos $1\mu\text{g}$ de los distintos ^3H -DNAs con 1000 unidades de DNasa I, durante los tiempos indicados en el Cuadro XII. Después de estos períodos de incubación, se precipitaron las muestras con ácido tricloroacético al 10% y seroalbúmina bovina (0,02%) y después de más de 30 minutos en frío, se centrifugaron y se midió la radioactividad de los sobrenadantes. En el Cuadro XII puede observarse que, en los primeros 30 minutos de contacto, la degradación del DNA de B. subtilis era superior a la detectada con DNA de T*4, mientras que la menor sensibilidad a la degradación enzimática se observaba con el DNA de T4. Después de 75 minutos de tratamiento con DNasa I, la degradación de los DNAs de B. subtilis y de T*4 es similar y superior en 3 veces a la detectada con DNA de T4.

Seguidamente, comparamos el efecto provocado por tratamiento con DNasa I o con DNA frío sobre muestras de cultivos competentes que habían sido preincubadas con DNAs de diferentes orígenes. En esta experiencia se añadía ^3H -DNA homólogo (de B. subtilis) o heterólogos (de T4 y T*4) ($1\mu\text{g/ml}$) a 1 ml de cultivo y, después de 20 minutos de incubación, se adicionaba DNA frío (de B. subtilis, T4 y T*4, respectivamente) o DNasa,

CUADRO XII. Sensibilidad de diferentes DNAs a DNasa I exógena

Tiempo de incubación con DNasa (min.)	μ g de ^3H -DNA degradado		
	<u>B. subtilis</u>	T*4	T4
0	0	0	0
15	0,014	0,0078	0,00043
30	0,020	0,0146	0,0086
45	0,041	0,0374	0,0303
60	0,056	0,054	0,0290
75	0,0905	0,094	0,0293

a las concentraciones indicadas en el Cuadro XIII. Después, se proseguía la incubación durante 10 minutos más y se medía la radioactividad asociada a las células.

Como puede comprobarse el tratamiento con DNasa es 22 veces más efectivo que la caza con DNA frío en la prueba realizada con ^3H -DNA de B. subtilis. En el caso del DNA de T*4, el tratamiento con DNasa I es unas 3 veces más eficiente que la caza y, finalmente, el DNA del fago T4 es mucho más desplazado por el tratamiento con DNA frío que por el enzima DNasa I (Cuadro XIII). Estos hechos parecen indicar que la mayor parte del DNA del fago T4 unido a las células competentes no se encuentra en el interior de dichas células, como parecían indicar las pruebas de incorporación de DNA, sino que el método de ensayo no era el adecuado para valorar la penetración en el caso de este DNA fágico que es poco sensible a la DNasa pancreática.

A continuación, realizamos unas experiencias de competición en transformación (como se ha descrito en los métodos), ya que queríamos comprobar si DNAs de distintos orígenes (bacterianos y fágicos) eran capaces de disminuir los niveles de transformación normales detectados con el DNA homólogo cuyos valores consideramos como 100%. En la figura 40 puede observarse que tanto los DNAs bacterianos como los fágicos (excepto el DNA del fago T4) eran capaces de inhibir la transformación en más de un 90% a unas concentraciones de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. Empleando concentraciones aún inferiores, se detectaba un gran desplazamiento. Sin embargo, el DNA del fago T4 utilizado a una concentración de $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, sólo conseguía disminuir los niveles de

CUADRO XIII. Desplazamiento de diferentes ^3H -DNAs a células competentes por tratamiento con DNasa I o caza con DNAs fríos

Muestras	^3H -DNA B. subtilis		^3H -DNA T*4		^3H -DNA T4	
	μg DNA unido/ 10^8 células	% *	μg DNA unido/ 10^8 células	% *	μg DNA unido/ 10^8 células	% *
Control	0,019	100	0,012	100	0,0096	10
+ 20 μg DNA frío **	0,018	94,7	0,011	91,6	0,0021	21,
+ 1000 unidades de DNasa I	0,00081	4,3	0,0042	38,2	0,0081	84,

(*): El porcentaje indica el % de ^3H -DNA retenido por las células

(**): En cada experiencia el DNA frío añadido era del mismo origen que el radioactivo utilizado

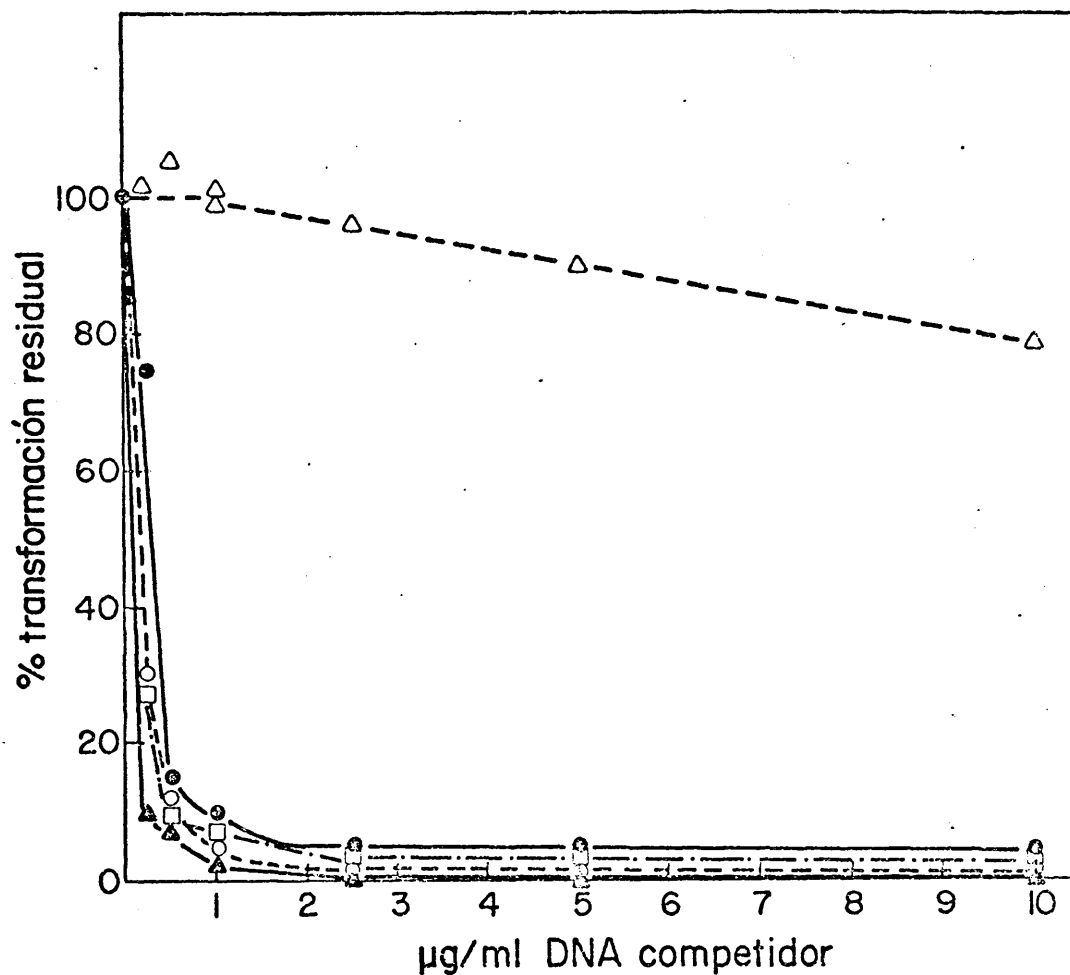


Fig. 40.- Competición de DNAs en transformación. A muestras de un cultivo competente de *B. subtilis* RUB 300 se añadió 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de DNA homólogo y cantidades crecientes de DNA de: *B. subtilis* RUB 305 (●); *M. lysodeikticus* (□); SPP1 (▲); T4 (Δ) y T*4 (○), realizando el experimento como se describe en los Métodos.

transformabilidad en un 20%.

Finalmente, estudiamos las competiciones entre diferentes DNAs en la capacidad de unión a los receptores específicos para DNA presentes en la membrana plasmática de células competentes.

En las figuras 41, 42 y 43 aparecen recogidas estas competiciones. Cuando empleábamos como DNA marcado el DNA de B. subtilis (Fig. 41), comprobamos que tanto el DNA homólogo como los DNAs de M. lysodeikticus, SPP1 y T*4 eran capaces de competir con el DNA tritiado, mientras que el DNA de T4 no era capaz de desplazar al DNA de B. subtilis. En la figura 42, aparecen las competiciones realizadas empleando ^3H -DNA del fago T*4. En este caso, el DNA frío del fago T4 tampoco era capaz de competir con el DNA marcado, mientras que el resto de los DNAs competidores empleados sí lo desplazaban. Sin embargo, cuando el DNA marcado procedía del fago T4 (Fig. 42) era desplazado por cualquiera de los DNAs competidores utilizados.

2. Estudio de la unión de DNAs de diferentes orígenes a protoplastos

La unión de ^3H -DNA de B. subtilis a protoplastos procedentes de células competentes y no competentes, empleando distintas concentraciones de DNA aparece recogida en la figura 44. Como puede verse en dicha figura, la unión a protoplastos aislados de cultivos competentes es específica y presenta dos niveles de saturación con 0,6 y $7\mu\text{g/ml}$ de DNA respectivamente.

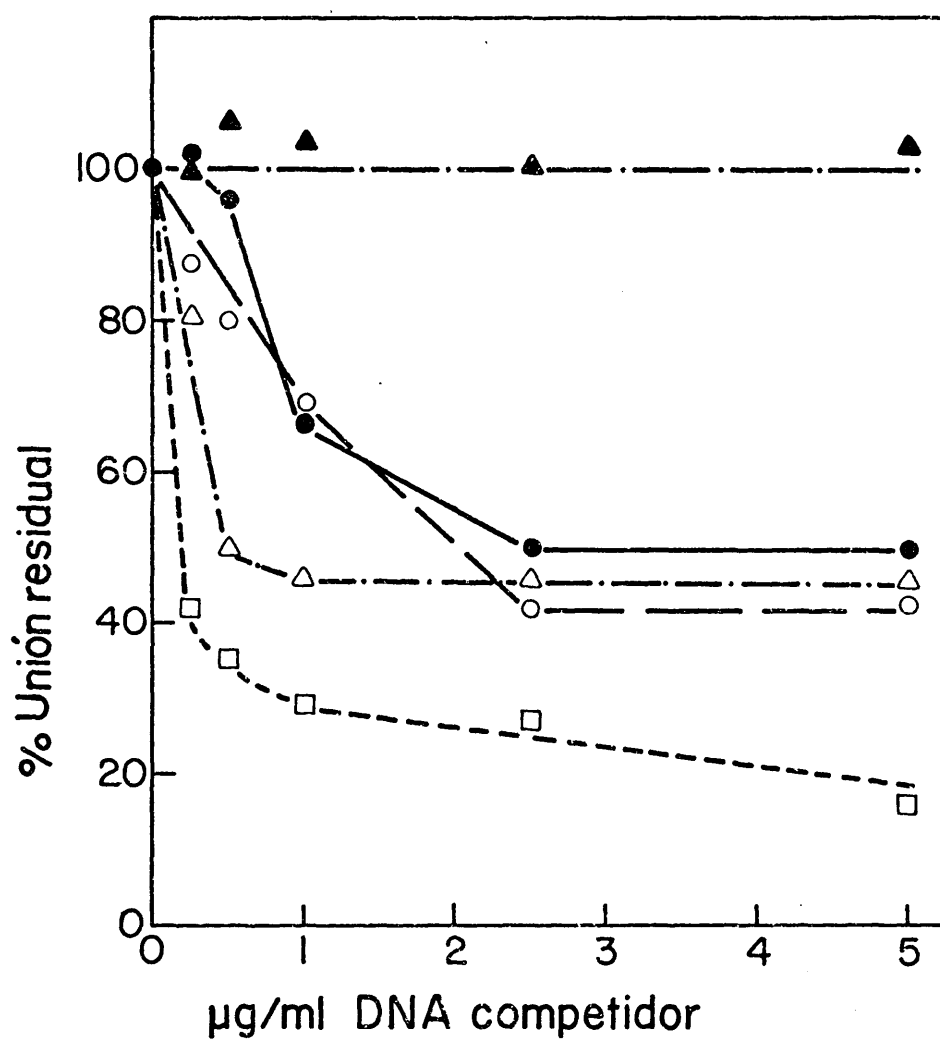


Fig. 41.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de *B. subtilis* a células competentes. Los DNAs competidores se aislaron de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (▲) = *M. lysodeikticus*; (□) = SPP1; (▲) = T4; (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

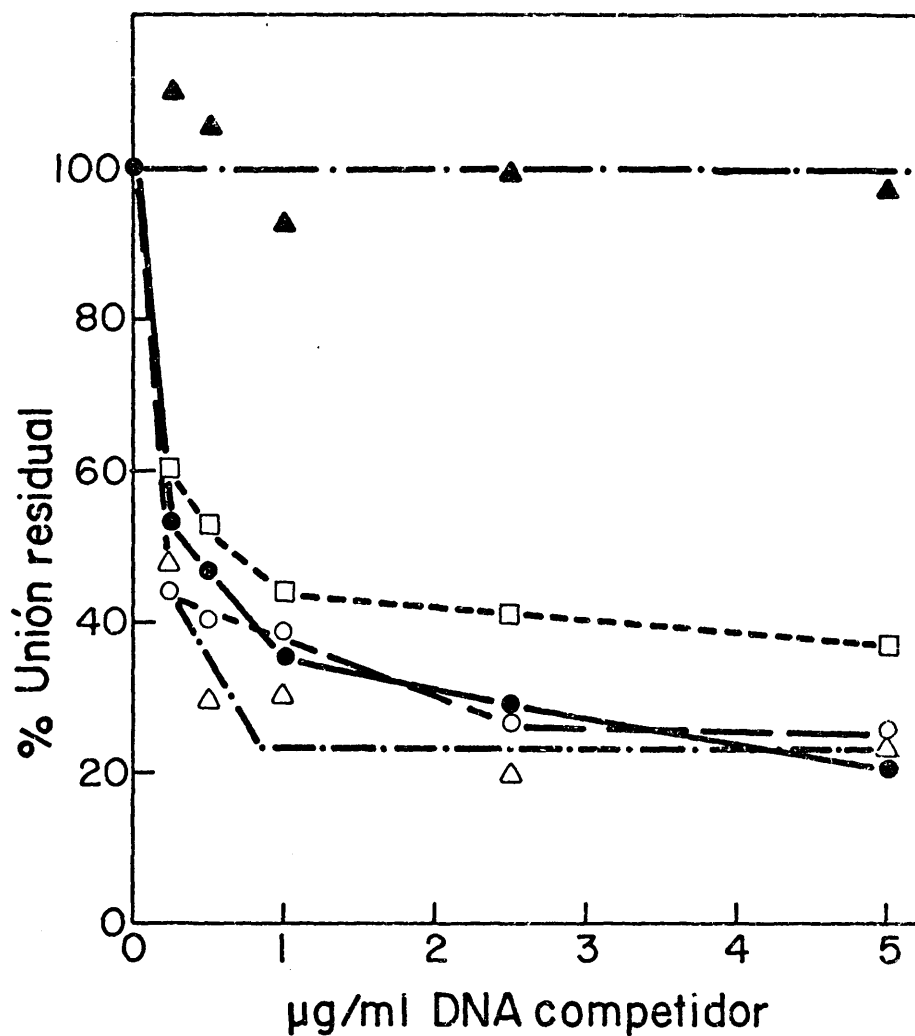


Fig. 42.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA del fago T*4 a células competentes. Los DNAs competidores se aislaron de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (▲) = *M. lysodeikticus*; (◻) = SPPI; (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

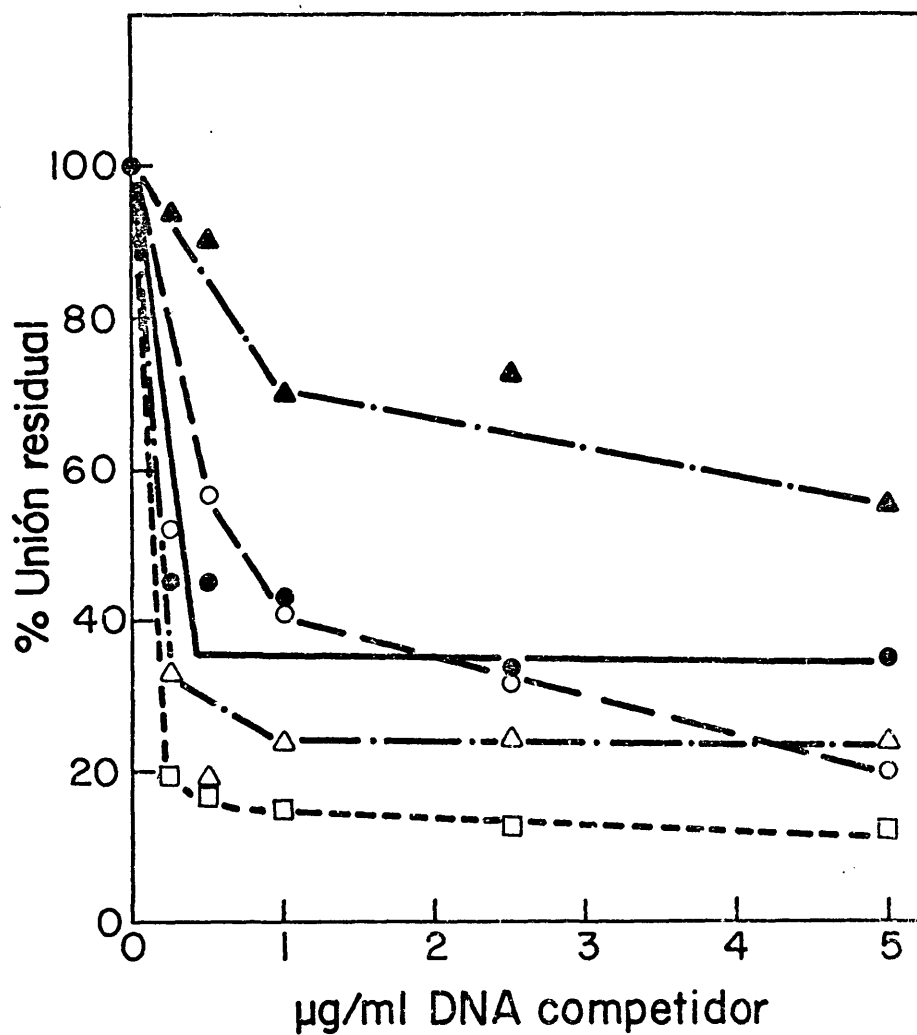


Fig. 43.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA del fago T4 a células competentes. Los DNAs competidores se aislaron de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (▲) = *M. lysodeikticus*; (□) = SPP1; (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

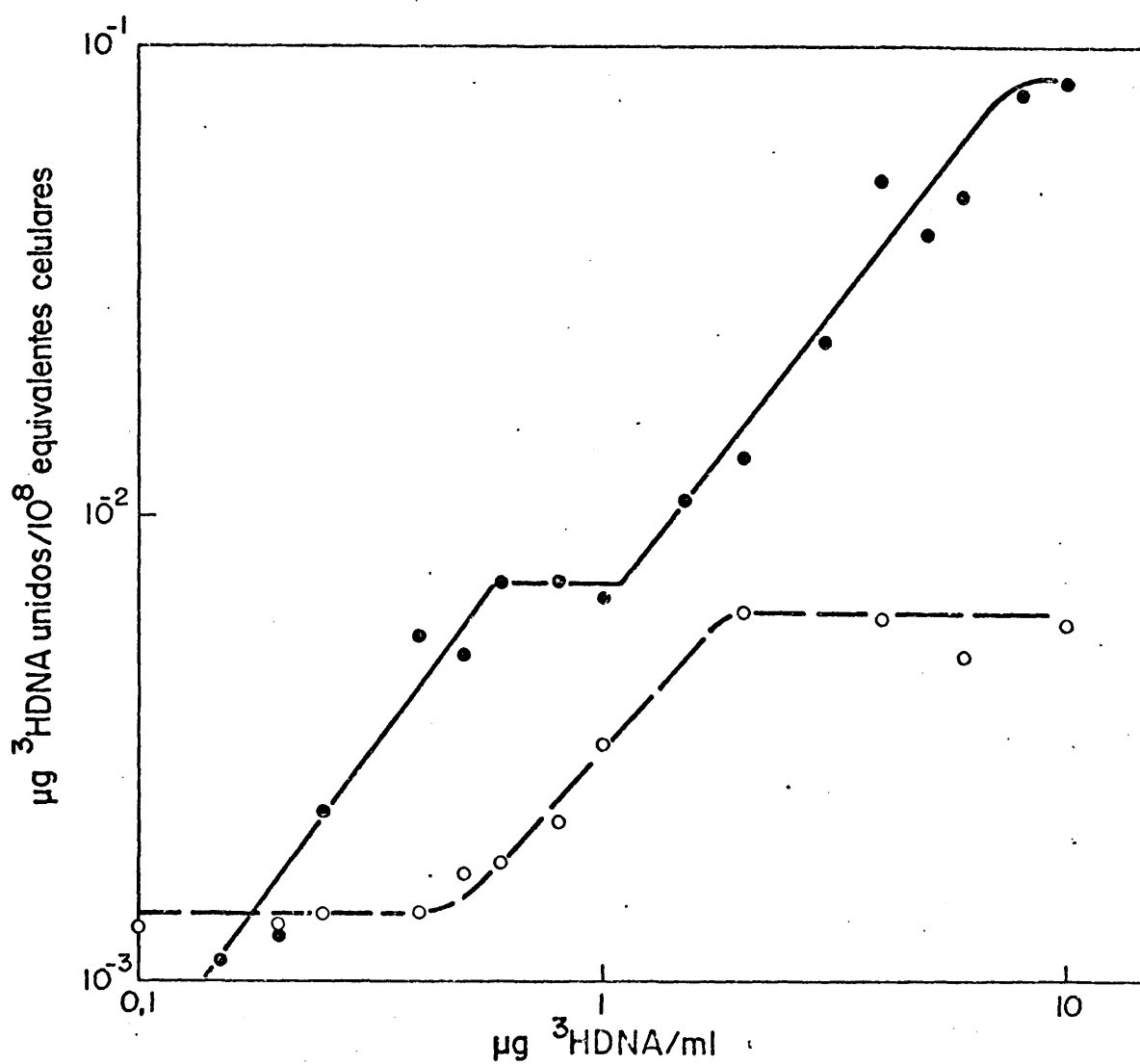


Fig. 44.- Unión de ^3H -DNA de *B. subtilis* a protoplastos aislados de un cultivo competente (●) y no competente (○). cada punto es la media de tres experimentos.

Seguidamente, estudiamos la misma prueba de unión utilizando ^3H -DNA del fago T*4, comprobando que los protoplastos preparados de células competentes unían mayor cantidad de DNA que los protoplastos de cultivos no competentes. Además, sólo se producía un nivel de saturación para una concentración de DNA de unos $2\mu\text{g/ml}$ (Fig. 45).

La unión de ^3H -DNA del fago T4 a protoplastos competentes era también específica, mostrando un sólo nivel de saturación para $1\mu\text{g/ml}$ de DNA, aproximadamente (Fig. 46).

En una etapa posterior, realizamos experiencias de competición en la capacidad de unión a protoplastos empleando distintos DNAs.

En la figura 47 se observa que el ^3H -DNA de B. subtilis era desplazado con una eficiencia similar por todos los DNAs empleados, incluso cuando el DNA competidor procedía del fago T4, a diferencia de lo observado en células, produciéndose unos niveles de inhibición entre el 70 y el 90% (empleando concentraciones de DNAs competidores de $5\mu\text{g/ml}$).

El ^3H -DNA del fago T*4 era desplazado en un 80% por el DNA de T4; aproximadamente del 60-50% con $5\mu\text{g/ml}$ de DNAs procedentes de M. lysodeikticus, SPP1 y T*4 y sólo un 20% cuando se empleaba DNA de B. subtilis (Fig. 48).

Cuando el ^3H -DNA empleado procedía del fago T4, los niveles de desplazamiento obtenidos, empleando $5\mu\text{g/ml}$ de DNA competidor, eran del 75% con DNA de T4, entre el 55 y el 45%

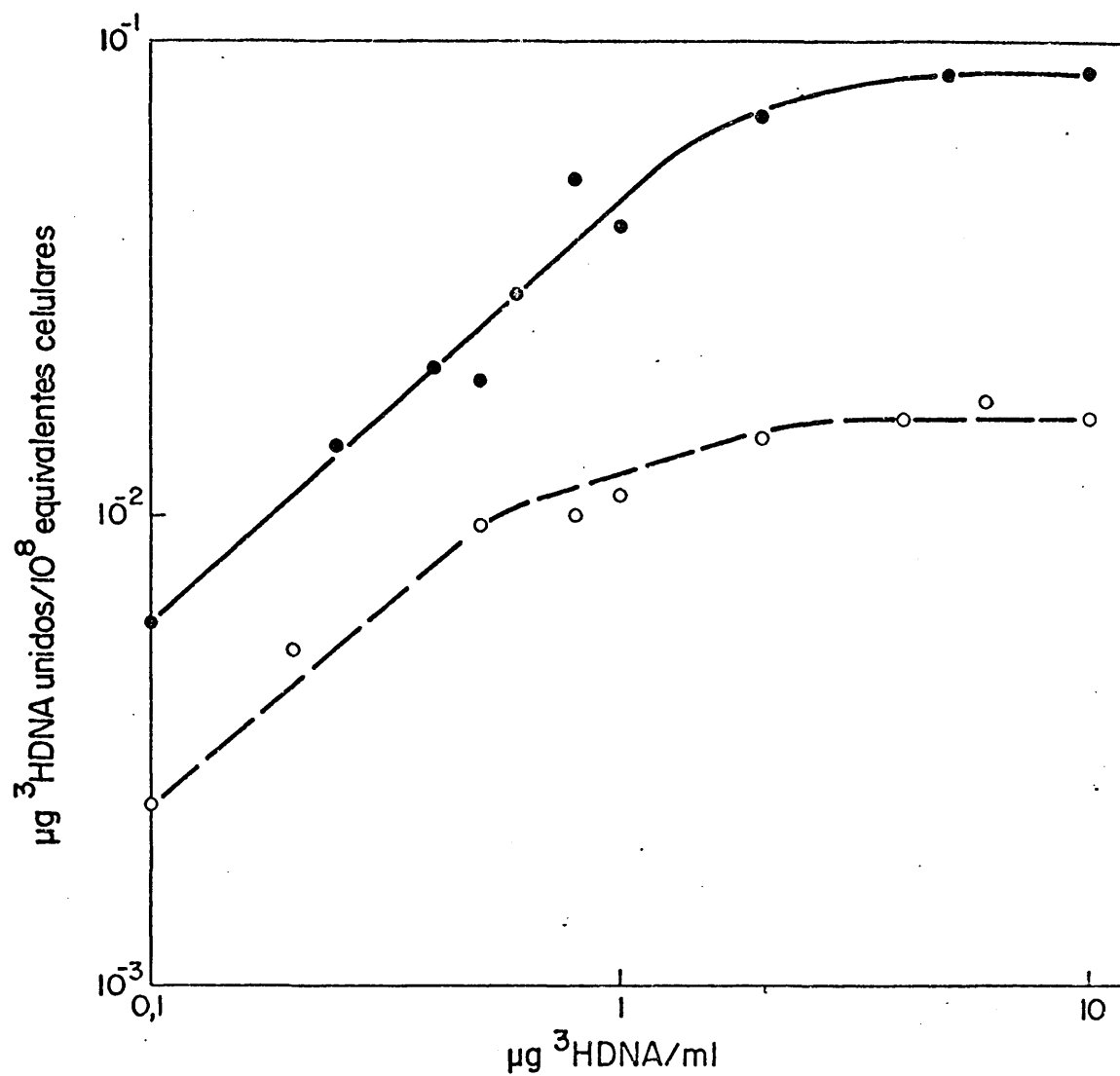


Fig. 45.- Unión de ^3H -DNA del fago T*4 a protoplastos aislados de cultivos competentes (●) y no competentes (○). Cada punto es la media de tres experimentos.

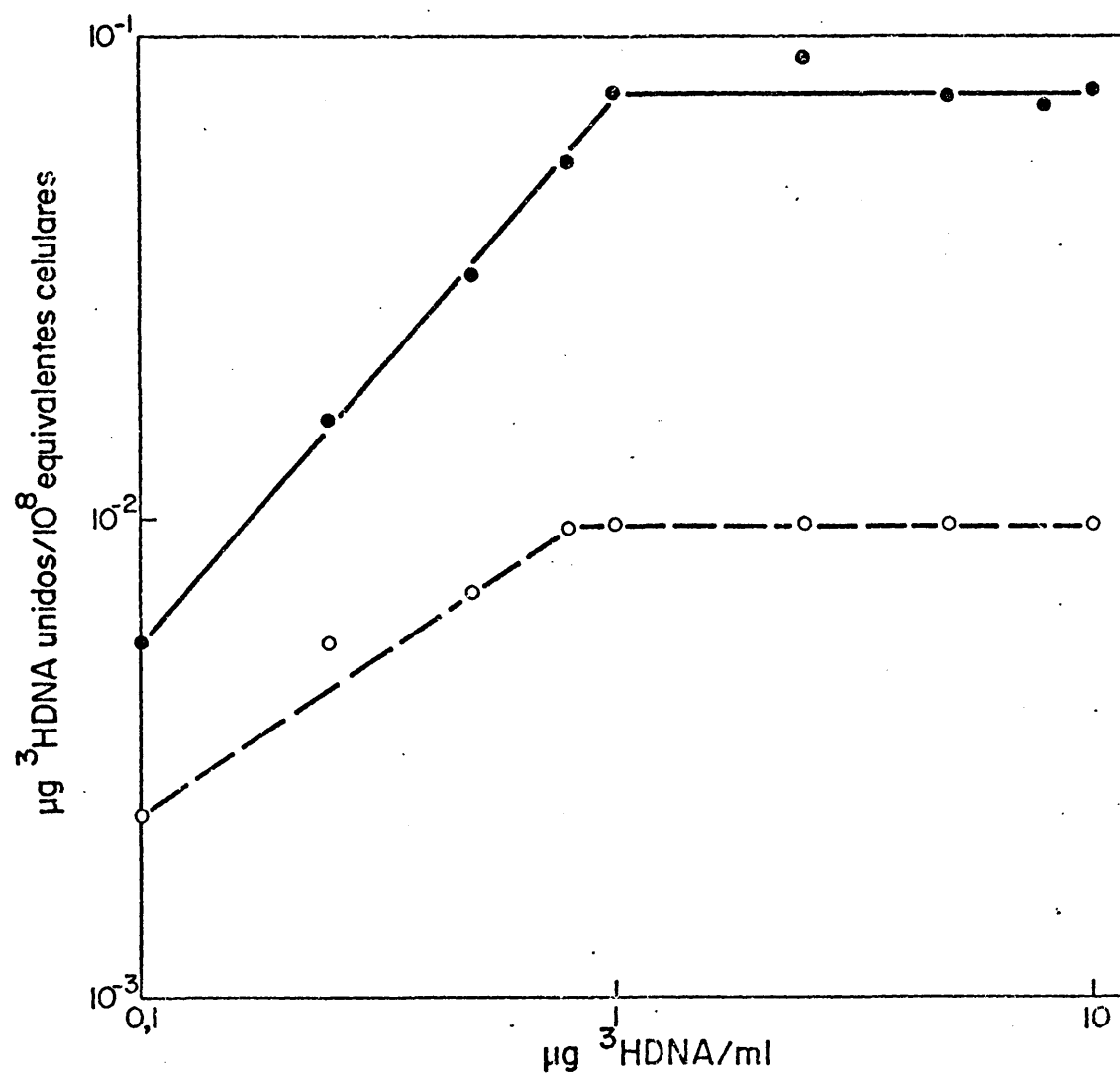


Fig. 46.- Unión de ^3H -DNA de T4 a protoplastos procedentes de cultivos competentes (●) y no competentes (○). Cada punto es la media de tres experimentos.

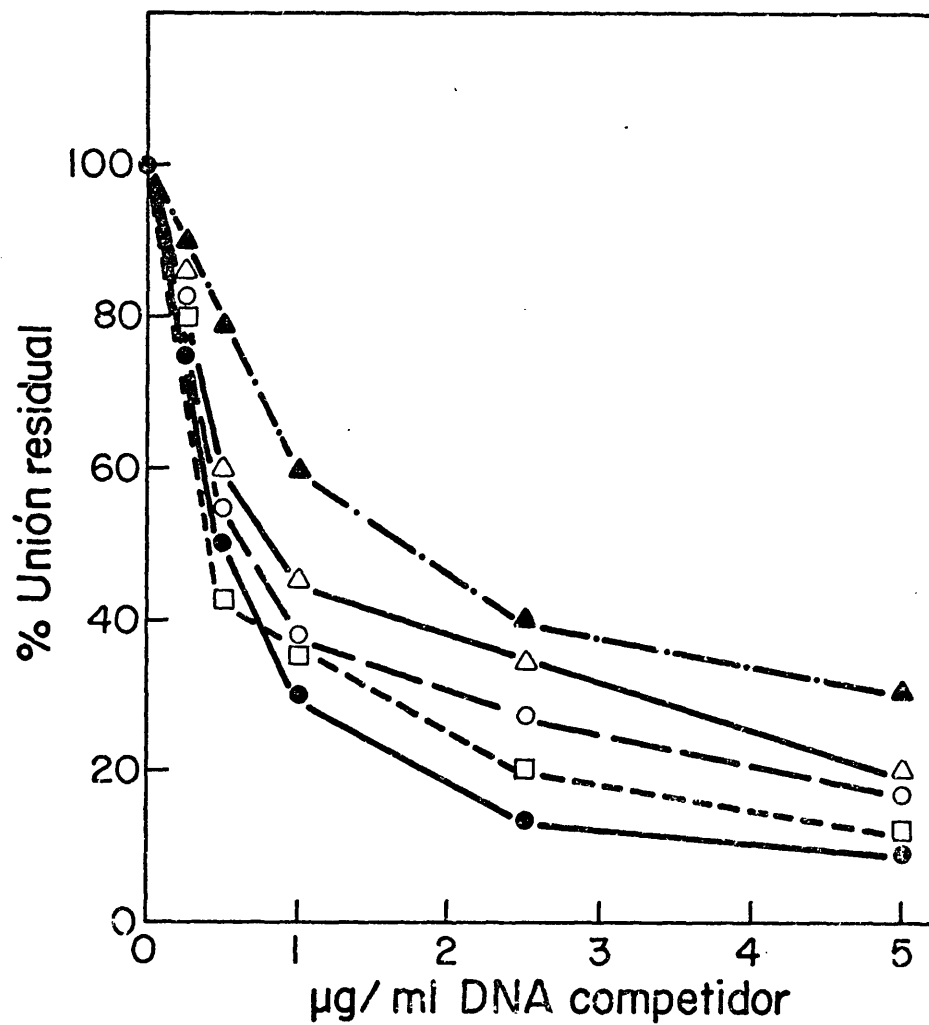


Fig. 47.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de *B. subtilis* a protoplastos aislados de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis*; (Δ) = *M. lysodeikticus*, (□) = SPP1; (▲) = T4; (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos

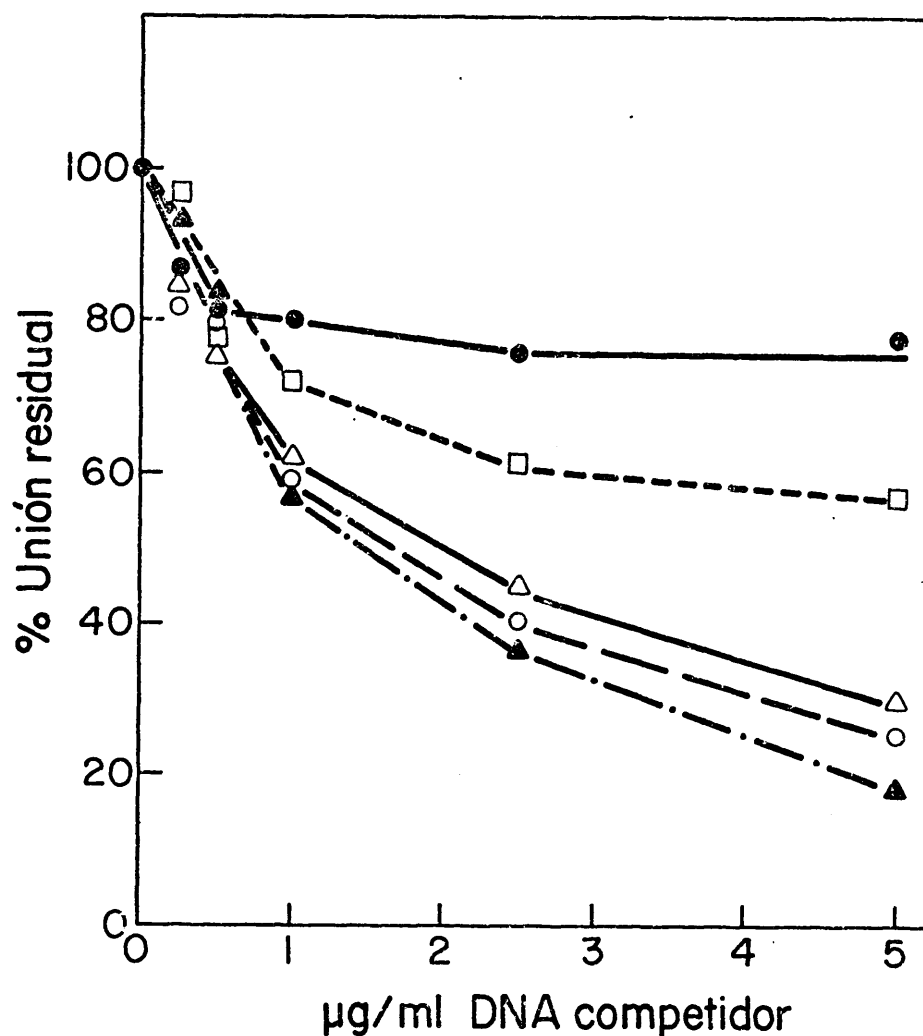


Fig. 48.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de T*4 a protoplastos aislados de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (Δ) = *M. lysodeikticus*; (◻) = SPP1; (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

con DNAs de T*4, M. lysodeicticus y SPP1 y sólo del 22% con DNA de B. subtilis (Fig. 49).

3. Estudio de la unión de diversos DNAs a vesículas membranosas

Una vez estudiadas las interacciones entre DNAs y protoplastos, quisimos comprobar si los DNAs de los fagos T*4 y T4 eran capaces de unirse a los receptores presentes en las vesículas membranosas.

En las figuras 50 y 51 pueden observarse que las curvas de unión a las vesículas con los DNAs de los fagos T4 y T*4 presentaban un sólo nivel de saturación para unas concentraciones de DNA de 0,6 μ g/ml y 1 μ g/ml, respectivamente.

En último lugar, quisimos estudiar el efecto competidor de diversos DNAs en la capacidad de unión de ^3H -DNA de B. subtilis, T*4 y T4 a vesículas membranosas como ya habíamos investigado previamente en células y protoplastos.

Las competiciones indicadas aparecen recogidas en las figuras 52, 53 y 54. En la figura 52 se observa que el DNA de B. subtilis era desplazado por todos los DNAs empleados. El ^3H -DNA de T*4 era poco desplazado por el DNA de B. subtilis, algo más por el DNA de SPP1 y en más de un 70% por los DNAs restantes (Fig. 53). En el caso del ^3H -DNA de T4, era desplazado por el DNA de B. subtilis en sólo un 14% y los demás DNAs producían una inhibición de los niveles de unión entre el 40 y el 70% (Fig. 54).

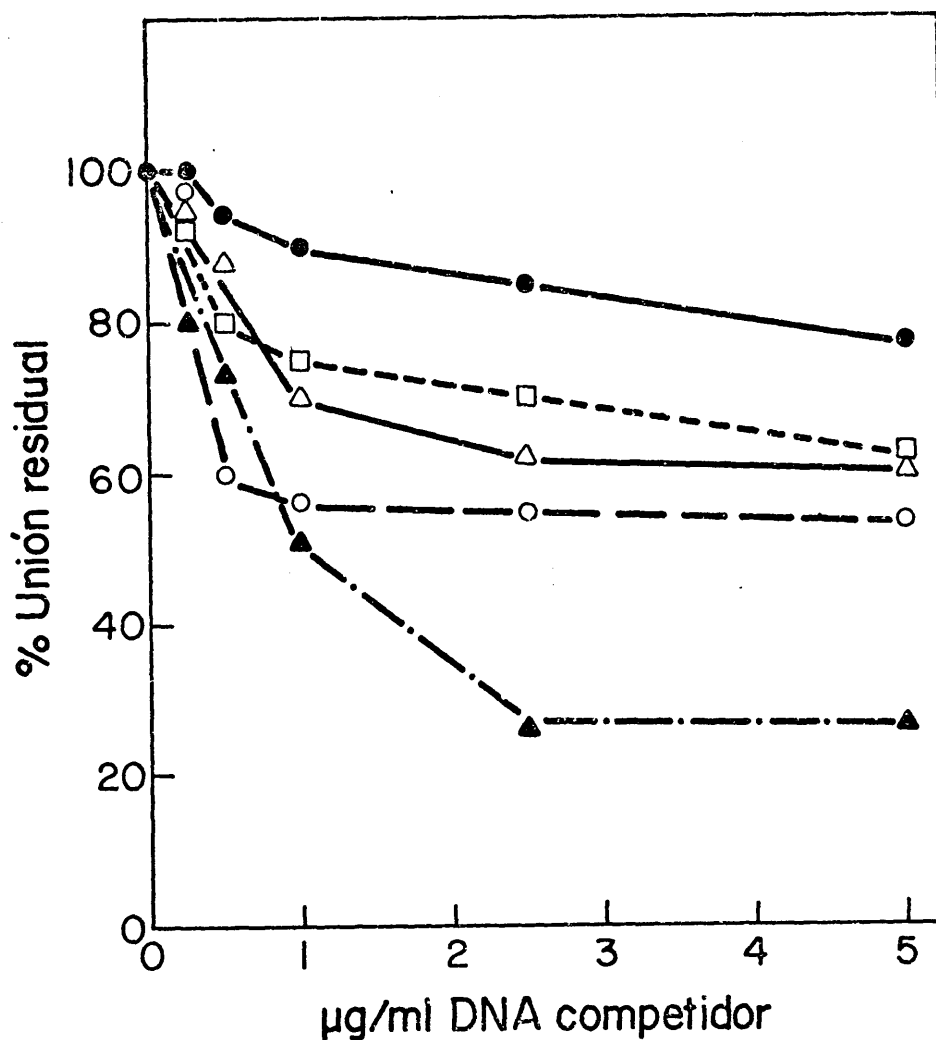


Fig. 49.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de T4 a protoplastos aislados de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (Δ) = *M. lysodeikticus*, (□) = SPPI1, (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

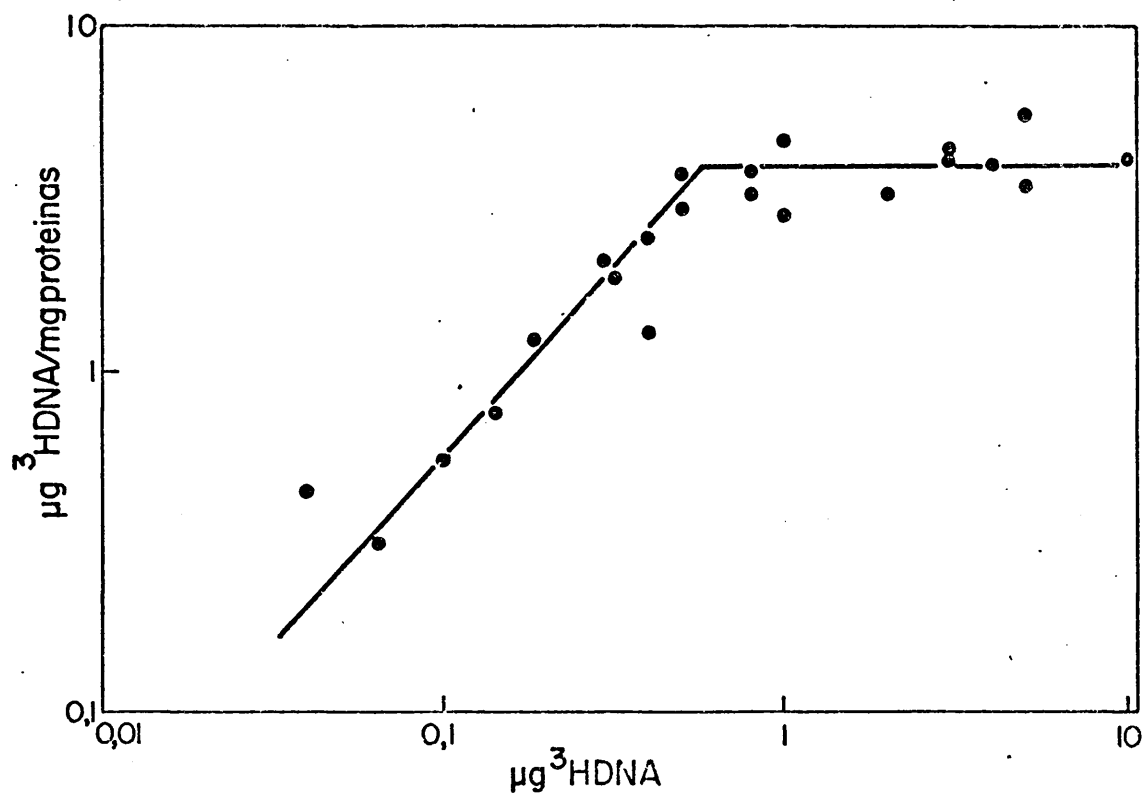


Fig. 50.- Unión de ^3H -DNA aislado del fago T4 a vesículas membranas procedentes de cultivos competentes.

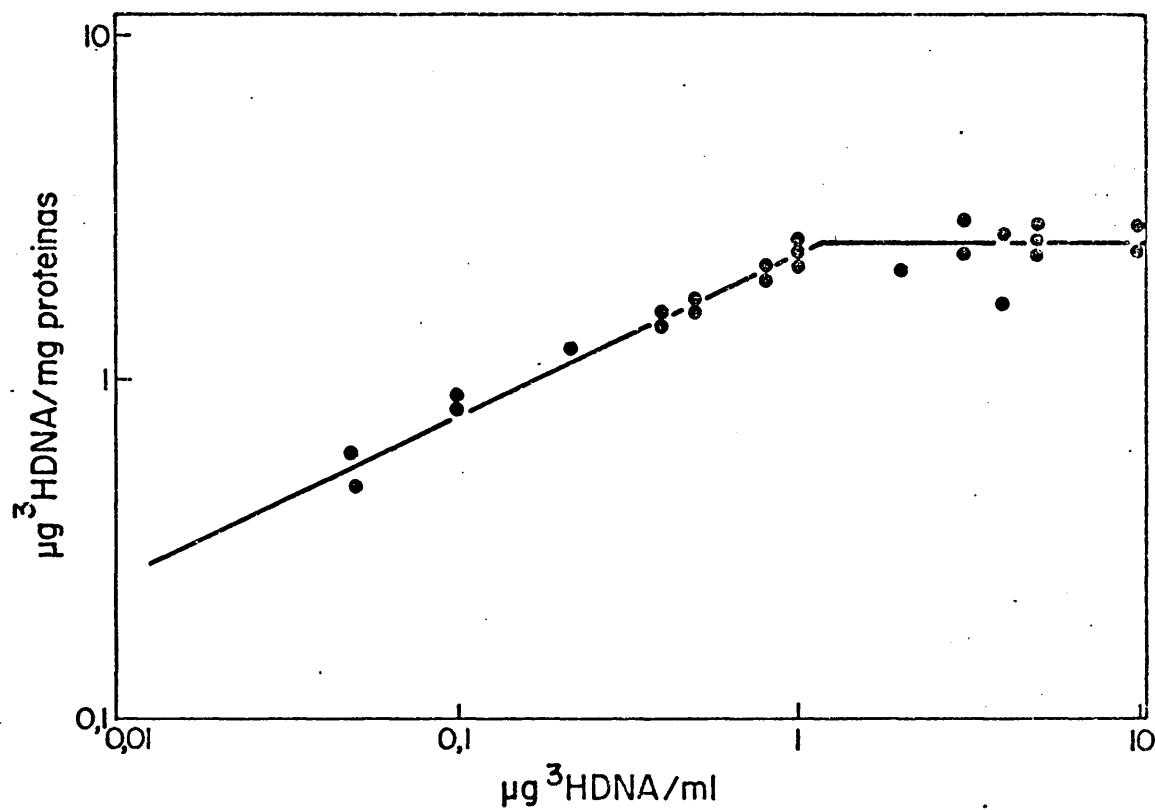


Fig. 51.- Unión de ^3H -DNA aislado del fago T*4 a vesículas membranosas procedentes de cultivos competentes.

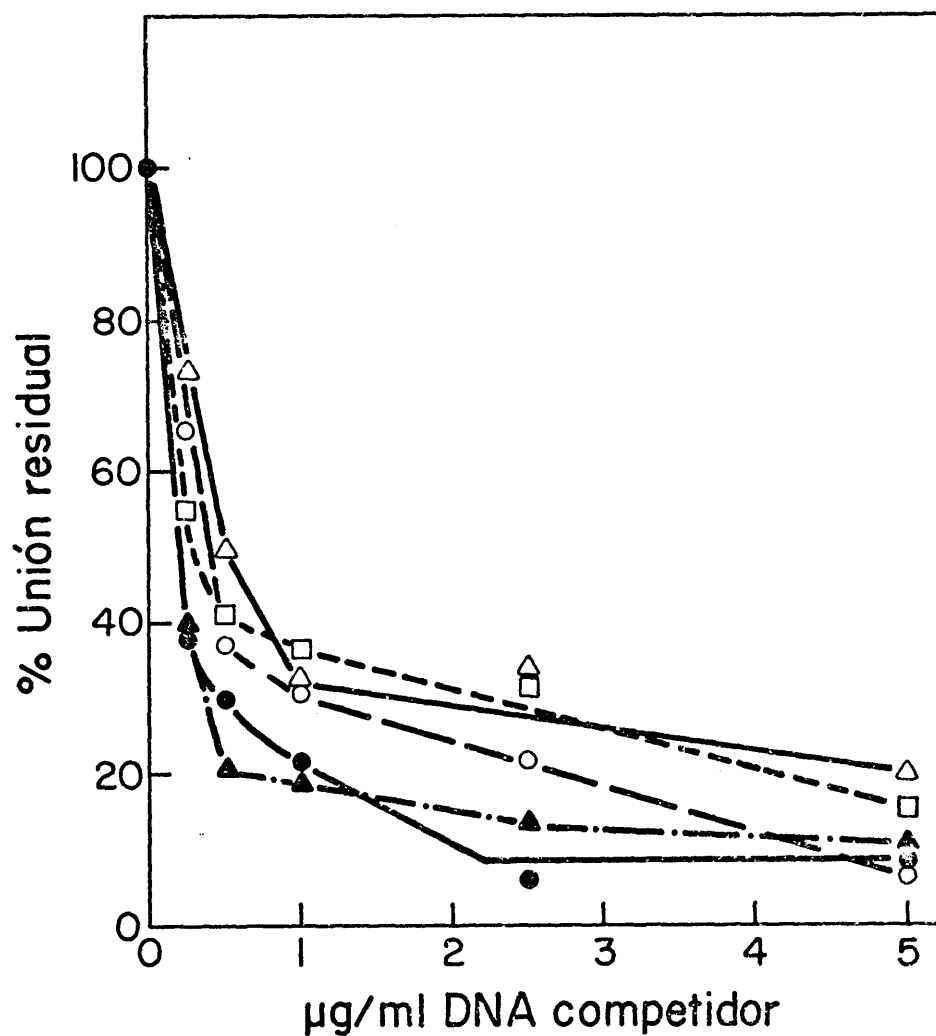


Fig. 52.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de *B. subtilis* RUB 305 a vesículas membranosas aisladas de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (Δ) = *M. lysodeikticus*; (◻) = SPPI1, (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

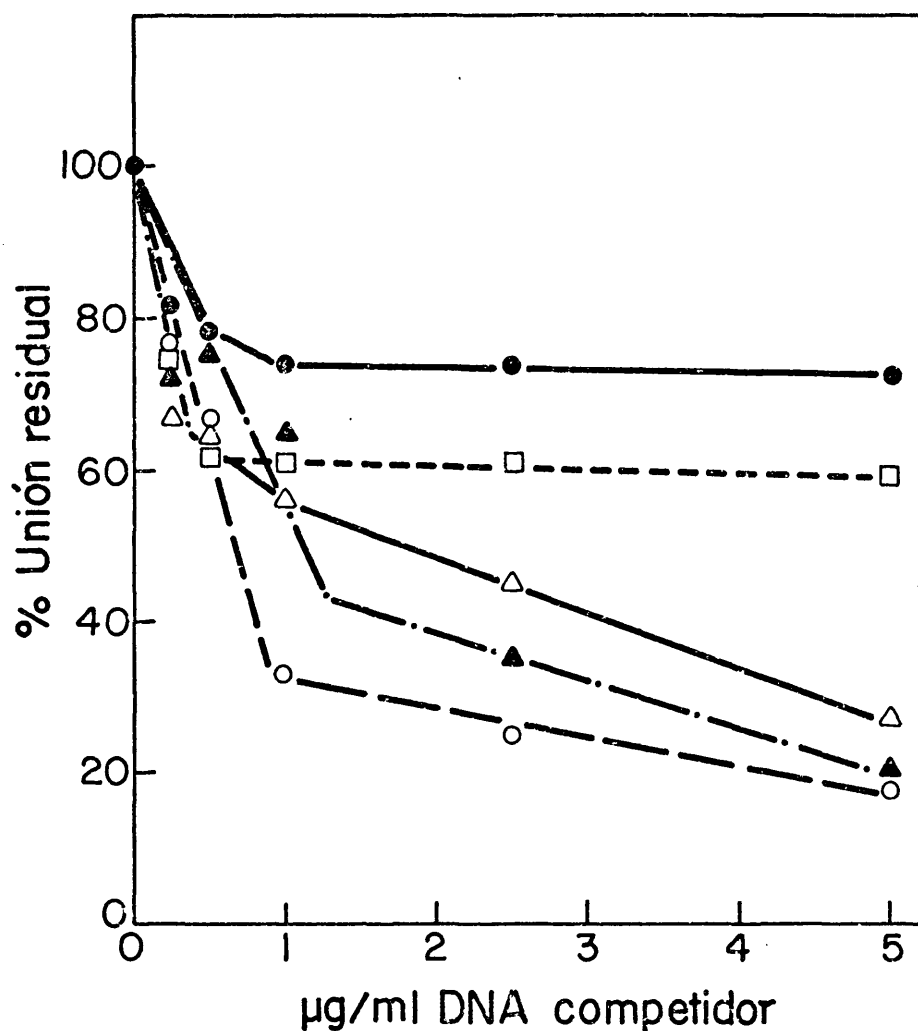


Fig. 53.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA del fago T*4 a vesículas membranosas aisladas de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (▲) = *M. lysodeikticus*; (◻) = SPPI; (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

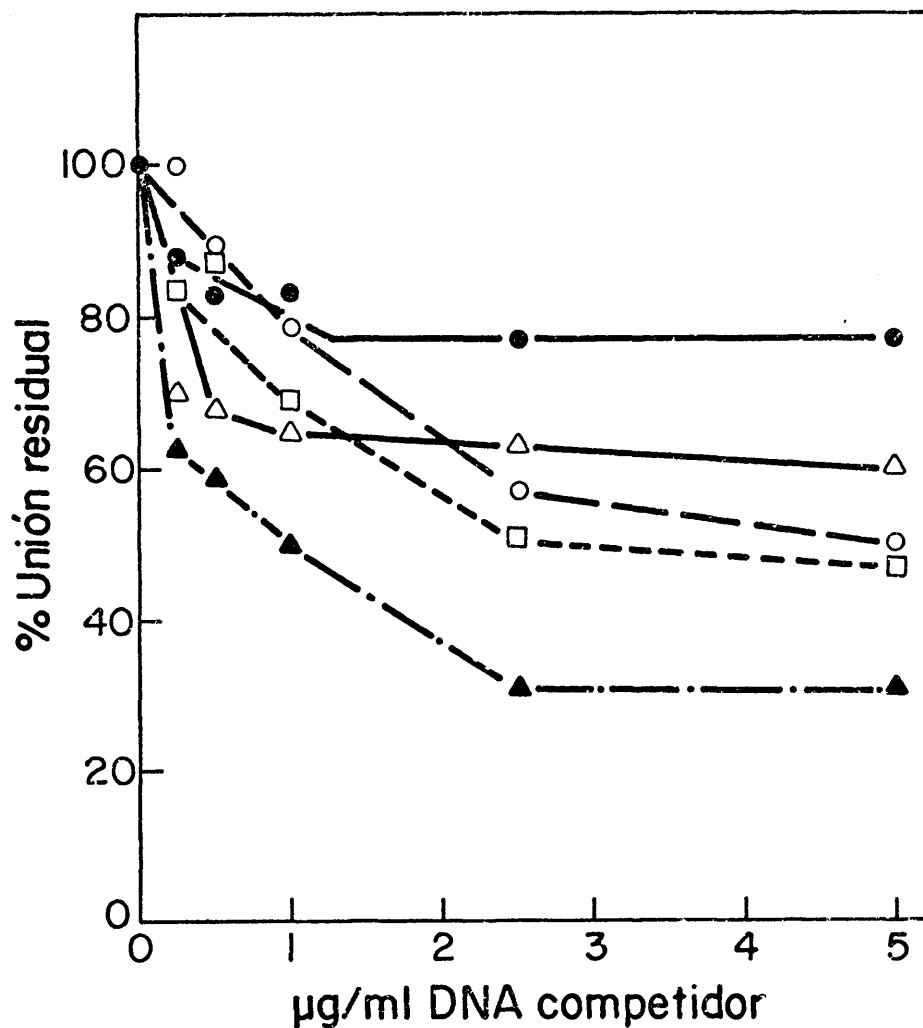


Fig. 54.- Competición de DNAs en unión de ^3H -DNA de T4 a vesículas membranosas aisladas de cultivos competentes. Los DNAs competidores procedían de: (●) = *B. subtilis* RUB 305; (Δ) = *M. lysodeikticus*; (□) = SPP1; (▲) = T4 y (○) = T*4. Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

Como puede observarse la respuesta detectada en las competiciones realizadas en sistemas in vitro son similares a las obtenidas empleando protoplastos.

VII . DISCUSION

Una vez finalizada la exposición de nuestro trabajo experimental, pasaremos a realizar una discusión detallada de los distintos experimentos que hemos llevado a cabo en esta Tesis. Con este propósito, consideraremos separadamente los resultados según las fases de nuestro protocolo de trabajo.

1. Condiciones Óptimas para el desarrollo de la competencia

Ya que existen diversos métodos, descritos en la literatura, para lograr que los cultivos desarrollen el estado de competencia, nuestros primeros esfuerzos estuvieron encaminados a establecer el método idóneo para nuestras condiciones experimentales.

Con este fin hemos estudiado comparativamente tres procedimientos clásicos de puesta en competencia (Figs. 17, 18, 19). El primer método (Fig. 17) presenta el inconveniente de ser demasiado lento, mientras que el segundo (Fig. 18) resulta ser relativamente poco reproducible.

El método descrito por YOUNG y WILSON (1972) (Fig. 19), produce los niveles de transformación más elevados y reproducibles, siendo la duración del máximo de competencia superior a tres horas.

En un paso posterior hemos establecido las condiciones experimentales óptimas introduciendo modificaciones al método de YOUNG y WILSON (1972). De la figura 20 puede concluirse que la sustitución del medio GM2 por el medio GM1 suplementado sólo con magnesio, después de la dilución 1/10, no afecta a los niveles de transformación alcanzados por los cultivos. Sin embargo, la eliminación del magnesio del medio de cultivo provoca una fuerte inhibición de la transformabilidad. La sustitución del medio GM2 por el BWC, después de la dilución 1/10, no resultó en un incremento de los niveles de transformabilidad (Fig. 20) aunque la mayor simplicidad de este medio aconsejó su uso en algunos experimentos.

Seguidamente, hemos comprobado que, en el sistema de B. subtilis, el calcio no puede sustituir al magnesio en el desarrollo de la competencia y en el proceso de transformación (Fig. 20, Cuadro IV). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por BUITENWERF y VENEMA (1977). Dichos autores observaron que el tratamiento de cultivos competentes con ácido etilén-glicol-bis-(aminoetil-éter)-N-N'-tetraacético (EGTA), que es un agente que se une preferencialmente al calcio (SCHMID y REILLEY, 1957), no tenía un efecto inhibitorio sobre la capacidad de incorporar DNA exógeno de los cultivos. Asimismo, nosotros hemos comprobado que la presencia en el medio de cultivo del calcio produce un efecto desestabilizador del desarrollo de la competencia (Fig. 21). Estas observaciones, realizadas en el sistema

de B. subtilis, muestran que el calcio no produce un efecto estimulante en el proceso de la transformación. Sin embargo, los resultados de SETO y TOMASZ (1976) en el sistema de S. pneumoniae, demuestran que el calcio, aunque no puede sustituir al magnesio en el desarrollo de la competencia, es requerido para el proceso de la transformación, produciendo su presencia una estimulación en los niveles de unión de DNA exógeno. Todos los hechos descritos previamente indican que el calcio juega un papel importante en la transformación en el sistema de S. pneumoniae, pero no tiene ninguna significación en el sistema de B. subtilis.

Por otra parte, los iones manganeso cobalto y zinc no son requeridos para el desarrollo de la competencia, ni pueden reemplazar al magnesio en su consecución (Cuadro IV).

2. Efecto del EDTA en los procesos de transmisión de información genética.

El estudio del efecto del EDTA sobre la transformación en el sistema de S. pneumoniae ha sido realizado por SETO y TOMASZ (1974). Dichos autores comprobaron que este compuesto produce un aumento de los niveles de unión del DNA a las células competentes, pero inhibe la aparición de transformantes.

Nuestro estudio del efecto del EDTA sobre los niveles de transformabilidad, en el sistema de B. subtilis, nos ha mostrado que este agente quelante provoca una inhibición de la transformación (Cuadro V y Fig. 22). Estos resultados coinciden con observaciones previas realizadas por otros

autores (BUITENWERF y VENEMA, 1977; JOENJE y VENEMA, 1975; MORRISON, 1971). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, el efecto inhibitorio del EDTA sobre la transformación, sólo puede ser revertido parcialmente por la adición de magnesio al medio. Cuando la concentración de EDTA empleada era de 10 mM se observa una recuperación del 50% (Cuadro V, experimentos 2, 3 y 4), mientras que con una concentración de 15 mM, sólo se recupera menos del 3% de los niveles de transformabilidad (Cuadro V, experimento 5). Estas observaciones no coinciden con los resultados de MORRISON (1971) ni con los de BUITENWERF y VENEMA (1977), ya que dichos autores logran revertir totalmente el efecto del EDTA, mediante la adición de magnesio, alcanzando los niveles de transformación del control después de la adición de dicho catión.

Por otra parte, tampoco logramos revertir el efecto del EDTA empleando calcio o manganeso (Cuadro VI) a diferencia de lo que ocurre en el sistema de S. pneumoniae donde el calcio, pero no el magnesio, elimina la acción inhibitoria del EDTA (SETO y TOMASZ, 1976).

Esta primera etapa de nuestros resultados parece indicar que el EDTA además de quelar cationes, afecta permanentemente alguna etapa implicada en el proceso de la transformación, ya que su efecto tampoco puede ser revertido por el empleo de otros cationes (Cuadro VI).

Por otra parte, se ha descrito que, en el sistema de S. pneumoniae, el EDTA estimula la capacidad celular de unir DNA exógeno, pero impide la aparición de DNA asociado

a las células en una forma resistente a la DNasa I (SETO y TOMASZ, 1974). En el sistema de B. subtilis, JOENJE y VENE-MA (1975) observaron que el EDTA inhibía en un 40% los niveles de unión del DNA a las células competentes. Sin embargo, las experiencias posteriores realizadas por BUITENWERF y VENE-MA (1977) mostraban que, en presencia de EDTA, se producía un incremento de 5 veces en los niveles de unión del DNA, en el sistema de B. subtilis, debido a que el efecto quelante del EDTA inhibe la actividad nucleolítica dependiente del magnesio que degradaría al DNA donador. Esta aparente discrepancia podría ser en parte explicada, porque en estos dos trabajos el método de desarrollo de la competencia utilizado fue diferente.

En nuestros experimentos (Cuadros VII, VIII y IX) hemos demostrado que el EDTA inhibe en un 76% la unión del DNA a las células competentes y, además, hemos encontrado que más del 90% del DNA unido a las células en presencia de este agente quelante se encuentra en una forma accesible a la DNasa I (Cuadro VIII). Nuestros resultados muestran que el efecto inhibitorio del EDTA sobre la capacidad de los cultivos para unir DNA exógeno parece ejercerse específicamente sobre las células competentes, ya que no hemos observado reducción de los niveles de unión en cultivos no competentes (Cuadro VII, experimento 3). Asimismo, hemos detectado resultados inhibitorios similares debidos al EDTA en los niveles de unión alcanzados en protoplastos (Cuadro IX) y vesículas membranosas (Fig. 36) procedentes de células competentes. Además, comprobamos que la unión de DNA a protoplastos procedentes de células no competentes no era afectada por la presencia de EDTA (Cuadro IX).

Estos resultados nos permiten concluir que el EDTA no sólo quela los cationes presentes en el medio sino que, además, provoca una alteración irreversible de los receptores específicos del DNA que se encuentran presentes en la membrana plasmática de las células competentes. Consecuentemente, a este hecho de alterar los receptores se debe el efecto inhibitorio del EDTA sobre los niveles de unión del DNA a la membrana, tanto en sistemas in vivo como en sistemas in vitro.

Una vez establecido que el empleo del EDTA no era un sistema adecuado para estudiar las primeras etapas de la transformación de B. subtilis, intentamos poner a punto un sistema experimental en el que no se produjera una alteración de los receptores específicos del DNA.

Nuestro método, consistente en la eliminación del magnesio del medio de cultivo, resultó ser un buen procedimiento para impedir la penetración del DNA transformante en las células competentes sin producir ninguna modificación en éstas.

La carencia de magnesio durante distintos períodos en el proceso de desarrollo de la competencia, produce una disminución en las frecuencias de transformación del cultivo, siendo este efecto más acusado cuanto mayor era el tiempo de incubación en ausencia de magnesio (Fig. 23).

No obstante, el efecto inhibitorio sobre la transformación producido por la ausencia de magnesio es revertido por la adición de dicho catión al medio, recuperándose los niveles de transformabilidad normales con sólo 10 minutos de

contacto con el magnesio (Fig. 24, curva A). El hecho de que no se observe un aumento en el número de transformantes para tiempos de contacto con magnesio prolongados, puede explicarse porque el DNA transformante está sometido a degradación nucleolítica producida por enzimas que requieren magnesio. Esta recuperación de los niveles de transformabilidad, como consecuencia de la adición de magnesio, indica que, en ausencia de este catión, las células son capaces de alcanzar el estado de competencia, pero no pueden incorporar el DNA transformante.

Por otra parte, cuando comparamos los niveles de recuperación de la transformación al añadir magnesio sólo (Curva A) o acompañado de DNA competidor (Curva B), comprobamos que la muestra que había estado 5 minutos en contacto con el DNA antes de adicionar el catión y el DNA competidor (Curva B) alcanza unos niveles de transformación únicamente del 10% comparado con los valores obtenidos cuando se añade al medio sólo magnesio (Curva A). Estos resultados demuestran que al adicionar dicho catión al medio, las células tienen capacidad de seguir uniendo DNA. Si esto no fuera así, sólo las moléculas que se han unido a los receptores en ausencia de magnesio podrían penetrar en el interior de las células competentes, y no tendría ningún efecto la adición del DNA competidor (Curva B). Ya que no hemos observado esta respuesta, podemos concluir que se produce una reiniciación del proceso de transformación por las moléculas de DNA libres en el medio.

A medida que el tiempo de contacto con el DNA en ausencia de magnesio se prolonga, las diferencias entre las curvas A y B disminuyen debido a que, en estas condiciones, los receptores se van saturando de DNA según transcurre el tiempo de incubación sin magnesio. Además, puesto que el tiempo total de contacto con el DNA transformante es de 45 minutos, las posibilidades de que las células puedan unir nuevas moléculas de DNA (después de que la adición de magnesio les permitiera incorporar el DNA que tenían previamente adsorbido) se van reduciendo con el tiempo, y por tanto el efecto del DNA competidor es menos acusado.

Finalmente, las curvas A y B llegan a tener un comportamiento idéntico cuando el tiempo de contacto de las células con el DNA, en presencia de magnesio, es sólo de 5 minutos o menos. Esto demuestra que cuando ya los receptores están saturados y el tiempo de incubación en presencia de magnesio es muy corto, no hay tiempo para que se vuelva a iniciar el proceso de transformación, de modo que la presencia de DNA competidor ya no ejerce ningún efecto.

La adición simultánea de DNAs competidor y transformante (Fig. 24 Curva C), da lugar a unos niveles de transformabilidad residuales.

Los experimentos recogidos en la figura 24, demuestran claramente que la ausencia de magnesio en el medio no produce ninguna lesión de los receptores.

Esta última conclusión está apoyada por el hecho de que la ausencia de magnesio en el medio afecta a la transformabilidad del cultivo, pero no a su capacidad para unir DNA exógeno, la cual es independiente de la cantidad de magnesio que haya en el medio (Fig. 25). Asimismo, en ausencia de magnesio el DNA unido a las células competentes se encuentra formando una asociación de la que puede ser eliminado por tratamiento con DNasa I (Cuadro VIII), con lo que demostramos que el DNA permanece unido normalmente, pero sin penetrar en el interior de las células competentes.

Por otra parte, el DNA que ha sido expuesto a cultivos competentes en ausencia de magnesio no sufre una pérdida de actividad biológica (Fig. 26). Esta observación puede ser explicada por el hecho de que, en ausencia de magnesio, no detectamos actividad exonucleásica de los cultivos sobre el DNA expuesto a ellos (Fig. 27). Nuestros resultados (Cuadro VIII, Figs. 26 y 27) indican que los receptores de las células competentes, en ausencia de magnesio, pueden unir DNA exógeno y que esta capacidad de unión no se altera con el tiempo, ya que después de 45 minutos de incubación las células unen mayor cantidad de DNA en ausencia que en presencia de magnesio (Cuadro VIII). Este hecho confirma que la falta de magnesio no produce una alteración de los receptores de las células competentes.

Además, JOENJE y VENEMA (1975) demostraron que alguna actividad exonucleásica dependiente del magnesio asociada a las células competentes debe estar implicada en la conversión del DNA unido de una forma reversible a una forma resistente a la DNasa I. Este hecho, junto con nuestros resultados, nos permiten concluir que los receptores específicos del DNA y la exonucleasa, que puede estar implicada en la incorporación del DNA, son dos componentes celulares distintos o un mismo componente

con dos funciones. Consecuentemente, nuestro procedimiento de eliminación del magnesio del medio de cultivo constituye un sistema que permite separar la etapa de unión del DNA a los receptores de la fase de incorporación al interior de las células, impidiendo que el DNA exógeno esté sometido a procesamiento enzimático.

3. Interacción entre DNA homólogo y membrana plasmática.

La presencia de los receptores específicos del DNA en la membrana celular, después de la eliminación de la pared, ha sido un punto muy debatido en distintos sistemas transformantes. En el sistema de S. pneumoniae, SETO y cols. (1975) han concluido que los receptores del DNA implicados en la transformación se liberan al medio durante el proceso de obtención de protoplastos.

En el sistema de B. subtilis, MILLER y cols. (1972) han sugerido que los receptores no permanecen asociados a los protoplastos. Sin embargo, dichos autores realizan sólo pruebas de incorporación de DNA exógeno, pero no estudian la capacidad de unión de los protoplastos procedentes de células competentes. Por lo tanto, de sus resultados puede concluirse que el DNA transformante no penetra en el interior de los protoplastos, pero no se puede excluir la posibilidad de que los receptores específicos del DNA estén presentes en los protoplastos.

Nuestros resultados muestran que los protoplastos procedentes de células competentes, en un medio que no contiene magnesio, son capaces de unir mayor cantidad de DNA

exógeno que las células utilizadas como controles (Cuadro IX). A la vista de este hecho, podemos concluir que los receptores específicos del DNA permanecen asociados a la membrana después de la obtención de los protoplastos. Además, parece existir un desenmascaramiento de algunos receptores, que estarían presentes en las células pero que no serían accesibles al DNA, debido a que la pared constituiría una barrera que impediría la unión del DNA a dichos receptores.

Por otra parte, los niveles de unión de DNA a protoplastos, en presencia de magnesio, constituyen un 40% comparado con los detectados en células (Cuadro IX), debido a la presencia de una actividad endonucleolítica que requiere magnesio asociada a los protoplastos (Figs. 28 y 29). Esta endonucleasa fué detectada por nosotros en gradientes de sacarosa, comprobando que produce roturas monocatenarias en el DNA transformante cuando hay magnesio presente en el medio (Fig. 29). Asimismo, tienen lugar roturas bicatenarias solamente a tiempos largos de incubación (Fig. 28). Como consecuencia de este ataque endonucleolítico, se produce una pérdida de la actividad biológica del DNA que es expuesto a protoplastos en presencia de magnesio (Fig. 30). Dicho DNA sufre una pérdida de su capacidad de unión a células competentes (Fig. 30 A) y también de su actividad transformante, siendo ésta mucho más acusada (Fig. 30 B).

Esta inactivación del DNA recuerda al fenómeno detectado por HASELTINE y FOX (1971). Dichos autores comprobaron que las células no competentes, obtenidas por fraccionamiento de un cultivo competente en gradientes de renografina, producían una

pérdida de la actividad biológica del DNA expuesto a ellas, coincidente con una reducción del peso molecular de dicho DNA. HASELTINE y FOX (1971) postularon que estos hechos eran debidos a la acción de una endonucleasa que degradaría el DNA transformante. Por otra parte, podemos concluir de nuestros resultados (Cuadro X) que el DNA unido a protoplastos, tanto en presencia como en ausencia de magnesio, no es capaz de penetrar en el interior de éstos, lo cual concuerda con los resultados de MILLER y cols. (1972).

La presencia de los receptores específicos del DNA en los complejos pared-membrana ha sido postulada por SETO y TOMASZ (1975 b) en el sistema de S. pneumoniae. Dichos autores afirman que los receptores están presentes en los complejos aislados de células competentes y no competentes. Este hecho parece indicar que durante el desarrollo de la competencia se produce un desenmascaramiento de los receptores que ya estarían presentes en las células no competentes. Sin embargo, en el sistema de B. subtilis, HAMPTON y ARCHER (1976) observaron que los complejos procedentes de células competentes unían mayor cantidad de DNA que los aislados a partir de células no competentes. Consecuentemente, en el desarrollo de la competencia de B. subtilis estaría implicada una síntesis de novo de los receptores, más que un desenmascaramiento de éstos.

Nuestros estudios de asociación de DNA transformante a complejos pared-membrana aislados de células competentes (Fig. 31) concuerdan con los resultados de HAMPTON y ARCHER (1976), pero nuestros niveles de unión son más elevados, ya que en el proceso de obtención de dichos complejos y en las pruebas de unión a ellos no empleamos EDTA, mientras que estos autores sí lo utilizaban.

Por otra parte, podemos concluir que los receptores no se encuentran situados en la pared celular, puesto que ésta no une DNA (Cuadro XI), sino que se encuentran situados en la membrana, como lo indican los resultados de las pruebas de unión de DNA a vesículas membranosas.

El establecimiento de las condiciones experimentales para realizar la unión de DNA a vesículas membranosas nos ha permitido comprobar que la eliminación del EDTA del proceso de obtención de vesículas no provoca alteraciones morfológicas de éstas, ni se observan restos apreciables de pared celular (Figs. 32 y 33). Asimismo hemos podido determinar que el DNA no unido a las membranas no interfiere con los resultados (Fig. 34), y que la cantidad de DNA unido es independiente de la concentración de proteínas utilizadas en un rango que varía entre 6 y 300 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 35).

HAMPTON y ARCHER (1976) realizaron experiencias de unión de DNA a mesosomas y a membranas citoplásmicas, concluyendo que el DNA presentaba mayor afinidad por los mesosomas, lo cual indicaría que los receptores se encuentran situados en dichas estructuras. Sin embargo, comparando los niveles de unión alcanzados por nosotros en vesículas membranosas con los resultados de dichos autores, comprobamos que sus niveles de DNA unido son menores, tanto en los mesosomas (2 veces) como en las membranas citoplásmicas (5 veces). Puesto que las vesículas membranosas están constituidas por fragmentos de membrana citoplásmica y de mesosomas, cabría esperar que los niveles de unión detectados en nuestros experimentos fueran inferiores

a los obtenidos por HAMPTON y ARCHER (1976). Esta discrepancia puede ser explicada si tenemos en cuenta que dichos autores emplean EDTA en sus experimentos, y ya hemos dicho previamente que este agente quelante altera los receptores del DNA.

Por otra parte, los resultados previos obtenidos por JOENJE y cols. (1975) en experiencias de unión de DNA a vesículas membranosas también indican que los receptores del DNA permanecen asociados a dichas estructuras puesto que las vesículas aisladas de células competentes, fraccionadas mediante el empleo de gradientes de renografina, unen mayor cantidad de DNA que las vesículas procedentes de células no competentes del mismo cultivo.

Sin embargo, SETO y cols. (1975) consideraban que los niveles de unión detectados por JOENJE y cols. (1975) eran demasiado bajos y podrían indicar una pérdida de receptores. Dichos autores basaban su afirmación en cálculos teóricos, considerando que, en el sistema de B. subtilis, 10^{10} equivalentes celulares que producen 0,1 mg de proteínas (vesículas membranosas) deberían unir aproximadamente $1\mu\text{g}$ de DNA, cuando se empleaba una concentración de DNA donador de $3\mu\text{g}$. En nuestros experimentos (Fig. 36), hemos encontrado que 0,1 mg de proteína corresponden a 4×10^9 células, aproximadamente, y esta cantidad de vesículas une $0,5\mu\text{g}$ de DNA para una concentración de DNA de $3\mu\text{g}$. Por tanto, 10^{10} equivalentes celulares unirían $1,25\mu\text{g}$ de DNA, lo que estaría de acuerdo con los cálculos teóricos de SETO y cols. (1975). Consecuentemente, podemos concluir que los receptores del DNA no se pierden durante el proceso de obtención de vesículas membranosas. Asimismo, po-

demos explicar los bajos niveles de unión detectados por JOENJE y cols. (1975), si tenemos en cuenta que dichos autores emplean EDTA en el proceso de obtención de las vesículas y en las pruebas de unión, lo que provocaría una alteración de los receptores. Esta hipótesis está apoyada por los resultados recogidos en la figura 36, ya que las vesículas obtenidas en presencia de EDTA unen menor cantidad de DNA que las obtenidas en ausencia de magnesio.

4. Asociación entre DNAs de distintos orígenes y estructuras periféricas celulares.

Las pruebas de unión de DNA homólogo a células (Fig. 37) indican que sólo existe un tipo de receptores específicos accesibles al DNA en las células competentes. Además, es necesaria una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ de DNA para que todos los receptores presentes en las células estén saturados.

Sin embargo, cuando eliminamos la pared bacteriana, observamos que los protoplastos (Fig. 44) y las vesículas membranosas (Fig. 36), en las pruebas de unión de DNA homólogo, presentan dos niveles de saturación que parecen indicar la existencia de dos tipos de receptores con distinta afinidad por el DNA.

El primer tipo correspondería a los receptores que se encuentran accesibles al DNA en las células y el segundo tipo (también presente en las células) estaría enmascarado por la pared celular, de modo que el DNA sólo podría interactuar con ellos, cuando la pared fuera eliminada.

Por otra parte, cuando en las experiencias de unión empleamos DNAs procedentes de los fagos de E. coli T*4 y T4, comprobamos que tanto en células (Figs. 38 y 39) como en protoplastos (Fig. 45 y 46) y en vesículas membranosas (Figs. 50 y 51), sólo se detecta un nivel de saturación. Para explicar este hecho podemos pensar en dos hipótesis alternativas: (1) que dichos DNAs sólo puedan unirse a un tipo de receptor que estaría accesible en las células, o (2) que una vez eliminada la pared celular estos DNAs presentaran igual afinidad por los dos tipos de receptores y se unieran indistintamente a unos u otros, alcanzando un nivel de saturación único cuando no quedara ningún receptor sin saturar. A favor de esta segunda hipótesis está el hecho de que los niveles de saturación de los DNAs de T*4 y T4 con protoplastos (Fig. 45 y 46) y vesículas (Figs. 50 y 51) fueron superiores a los obtenidos con células (Figs. 38 y 39).

Los resultados de caza de DNAs unidos a células competentes (Cuadro XIII), muestran que el DNA de B. subtilis unido a células no puede ser desplazado por la adición de un exceso (20 veces) de DNA homólogo, lo cual indica que la unión del DNA a los receptores es estable y no dinámica, puesto que si el DNA se uniera y liberara continuamente al medio, al adicionar DNA frío se observaría una disminución de los niveles de unión. En el caso del DNA del fago T*4 se observa un comportamiento similar al DNA de B. subtilis en lo que respecta a la caza, pero la sensibilidad del DNA unido a células a la DNasa I, es menor (Cuadro XIII). Este hecho, junto con la observación de la baja sensibilidad del DNA de T*4 a la DNasa para tiempos cortos de incubación (Cuadro XII), indica que posiblemente no todo el DNA que hemos detectado como incorporado a células (Fig. 38) ha

penetrado en el interior de las células receptoras. Con respecto al DNA del fago T4 hemos observado un considerable desplazamiento (80% aproximadamente) producido por la adición de DNA frío (Cuadro XIII), que es muy superior al detectado empleando DNasa pancreática. No obstante, este hecho es debido a la baja sensibilidad de dicho DNA al tratamiento con la DNasa I (Cuadro XII).

Por otra parte, cuando realizamos experiencias de competición en transformación (Fig. 40) observamos que todos los DNAs empleados desplazan al DNA de B. subtilis excepto el DNA del fago T4. Obtuvimos los mismos resultados en las pruebas de competición para la unión (Fig. 41), pero los niveles de inhibición son menores. Las diferencias detectadas en las competiciones en transformación y en unión pueden ser explicadas si tenemos en cuenta que en el primer caso realizamos las experiencias en presencia de magnesio y en el segundo no había magnesio en el medio. Esto indica que en la transformación los DNAs no sólo compiten por los receptores, sino que además lo hacen por los sistemas de incorporación. Estos hechos implican que tanto los DNAs homólogos como los heterólogos (excepto el DNA del fago T4) se unen al mismo tipo de receptor en células.

Un fenómeno similar ha sido observado por SOLTYK y cols. (1975) utilizando el DNA glucosilado del colifago T6, tanto en experimentos de incorporación como de transformación.

En cuanto al DNA del fago T4, TOMASZ (1973) encontró, que en el sistema de S.pneumoniae, este DNA es capaz de competir en transformación con mayor eficacia que el propio DNA ho-

mólogo. Sin embargo, en el mismo sistema bacteriano, LACKS (1977) observó que el DNA de T4 no compite apreciablemente, con el DNA del colifago no glucosilado T7 en la unión a los receptores. A pesar de ello, LACKS (1977) no considera concluyentes tales diferencias.

Resultados similares a los de LACKS (1977) habían sido obtenidos previamente por CEGLOWSKI y cols. (1975), en el sistema de S. sanguis. Estos autores observaron que dicho DNA compite muy poco con el DNA homólogo en experimentos de transformación. CEGLOWSKI y cols. (1975) postulan que la ineficacia competidora del DNA del fago T4 se debería a la glucosilación de este DNA que impediría su unión a las células.

Nuestros resultados demuestran claramente (Fig. 39) que, por lo menos en el sistema de B. subtilis, el DNA de T4 es capaz de unirse a las células competentes. Por tanto, es necesario buscar otra causa para explicar el comportamiento del DNA de este fago en las competiciones con el DNA homólogo. Cabría considerar dos posibilidades: (1) podría presentar menor afinidad por los receptores que el DNA de B. subtilis debido a la glucosilación de dicho DNA o (2) podría unirse a unos receptores diferentes con los que no interaccionaran los otros DNAs probados. La segunda hipótesis queda descartada puesto que el DNA de T4 es desplazado por todos los DNAs incluido el de B. subtilis (Fig. 43).

Las competiciones realizadas con ^3H -DNA de T*4 en células (Fig. 42) muestran un comportamiento similar al detectado empleando ^3H -DNA de B. subtilis lo que nos permite concluir que

estos microorganismos no discriminan entre los DNAs homólogos y heterólogos en cuanto a su capacidad de unión. Los hechos descritos previamente indican que todos los DNAs se unirían al mismo tipo de receptor, en células, presentando los DNAs de B. subtilis y T*4 una afinidad similar por dichos receptores.

Sin embargo, cuando realizamos competiciones en la capacidad de unión de distintos DNAs a protoplastos, observamos una modificación del comportamiento de los DNAs de T4 y B. subtilis, de tal modo que el DNA de T4 desplaza a los ^3H -DNAs de B. subtilis y T*4 (Fig. 47 y 48), mientras que el DNA de B. subtilis no consigue desplazar a los ^3H -DNAs de T*4 y T4 (Figs. 48 y 49). Un comportamiento similar fue detectado en las competiciones realizadas en vesículas membranosas (Figs. 52, 53 y 54).

Este comportamiento diferencial de los DNAs en todos los experimentos de competición (Figs. 41 a 43; 47 a 49 y 52 a 54), junto con la existencia de dos niveles de saturación con DNA de B. subtilis (Figs. 36 y 44) y de uno con los DNAs de los colifagos T4 y T*4 (Figs. 45 y 46; 50 y 51), podrían ser explicadas por la hipótesis antes expuesta de la existencia de dos tipos de receptores específicos del DNA en las células competentes de B. subtilis. Debemos considerar además que la glucosilación del DNA del fago T4 dificulta la accesibilidad de este DNA a los receptores y que, una vez eliminada la pared celular, la afinidad del DNA de T4 parece ser mayor que la de los DNAs de B. subtilis y T*4. Así, podemos establecer la afinidad de los DNAs por los receptores de la siguiente manera: para el primer tipo de receptores, cualquier tipo de

DNA presentaría una afinidad similar; mientras que los DNAs heterólogos presentarían mayor afinidad que el DNA homólogo por el segundo tipo de receptores.

Como resumen de esta última parte de nuestros experimentos, en la figura 55 se muestra un modelo que recoge nuestras hipótesis acerca de los receptores específicos del DNA, así como los principales resultados que apoyan dichas hipótesis.

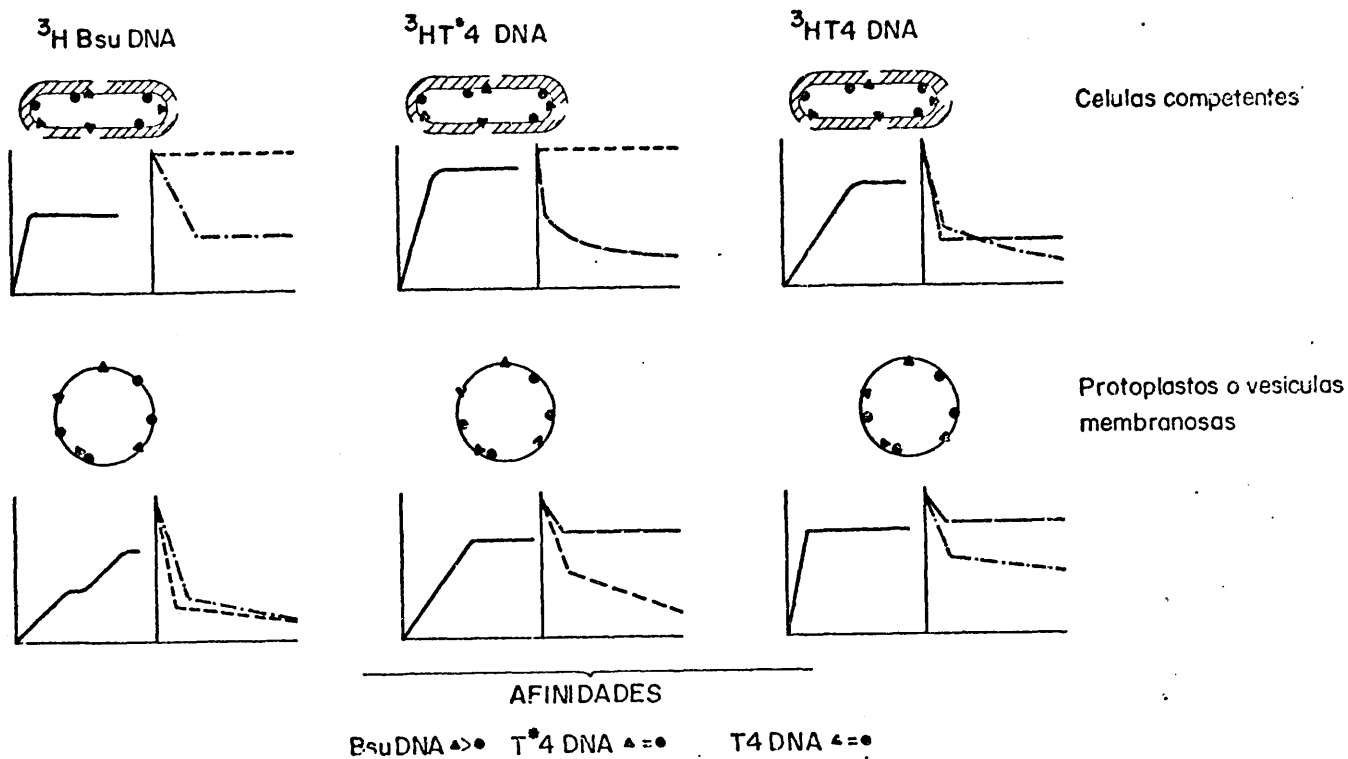


Fig. 55.- Modelo hipotético de la existencia de dos tipos de receptores específicos del DNA en células competentes de *B. subtilis*. Las gráficas muestran las cinéticas de saturación (—) y la capacidad competidora de los DNAs de *B. subtilis* (— — — —), T*4 (— · — · —) y T4 (· · · · ·). Los receptores (●) sólo serían accesibles a los DNAs cuando se elimina la pared bacteriana (zona rayada), mientras que los receptores (▲) estarían accesibles a los DNAs en todos los casos.

VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Después de considerar los resultados descritos en esta Memoria, pasaremos a resumir nuestras principales aportaciones en el campo de la transformación bacteriana:

a) Se ha estudiado de un modo comparativo y se ha confirmado experimentalmente las características de tres métodos diferentes para desarrollar el estado de competencia en B. subtilis: los de BOTT y WILSON (1968), JOENJE y VENEMA (1975) y YOUNG y WILSON (1972)

b) Después de elegir el método de YOUNG y WILSON para nuestro trabajo experimental, hemos introducido modificaciones en dicho método para desarrollar la competencia, con el fin de alcanzar unas condiciones experimentales óptimas.

c) Este método modificado nos ha permitido estudiar la influencia de diversos cationes divalentes (magnesio, manganeso, cobalto y cinc) en el desarrollo de la competencia.

d) Por otra parte, empleando este método de competencia modificado, hemos estudiado el papel de calcio en el desarro-

llo de la competencia y en el proceso de transformación.

e) Además, hemos investigado el efecto del EDTA en el proceso de la transformación así como la posible reversión de dicho efecto mediante la adición de magnesio y otros cationes divalentes, en distintas condiciones experimentales.

f) Asimismo, hemos estudiado la capacidad para unir DNA que presentan las células, protoplastos y vesículas membranosas en presencia de EDTA.

g) También hemos investigado la influencia del magnesio en la unión y penetración del DNA, así como en la aparición de transformantes en el proceso de transformación.

h) Seguidamente, hemos estudiado las interacciones entre el DNA de B. subtilis y protoplastos aislados de células competentes, tanto en presencia como en ausencia de magnesio.

i) Una vez establecidas las interacciones DNA-protoplastos, hemos investigado las características del DNA homólogo que ha sido expuesto a dichos protoplastos en un medio suplementado o no con magnesio.

j) Asimismo, hemos estudiado la capacidad para unir DNA de los complejos pared-membrana y de las paredes.

k) Por otra parte, hemos establecido las condiciones experimentales idóneas para la obtención de vesículas membranosas y para la unión de DNA a estas estructuras modificando los métodos de JOENJE y cols. (1974).

l) Mediante el empleo de vesículas membranosas, se han estudiado las interacciones del DNA de B. subtilis con membranas citoplásmicas aisladas de cultivos competentes.

m) Seguidamente, hemos realizado un estudio comparativo de las interacciones DNA-membrana en células, protoplastos y vesículas membranosas procedentes de cultivos competentes, empleando DNA homólogo y DNAs heterólogos aislados de los fagos de E. coli T4 y T*4.

n) Hemos investigado la capacidad competidora de DNAs de distintos orígenes en el proceso de transformación de B. subtilis.

o) La utilización de DNAs heterólogos bacterianos y fágicos nos ha permitido estudiar la afinidad del DNA de B. subtilis por los receptores específicos presentes en la membrana.

p) Finalmente, el empleo de este método de competición de los DNAs en la capacidad de unión a los receptores, nos ha permitido analizar la afinidad por dichos receptores de los DNAs de los fagos T4 y T*4.

A partir de este resumen, y a la vista de los resultados obtenidos, es posible sacar las siguientes conclusiones en relación a la unión y expresión de DNA transformante en células competentes, así como a las interacciones DNA-membrana en el sistema transformante de B. subtilis:

1) Hemos comprobado que el método de YOUNG y WILSON (1972) para desarrollar la competencia constituye el procedimiento más adecuado para nuestras necesidades experimentales.

2) Se han establecido las condiciones óptimas de este método de competencia, sustituyendo el medio GM2 por medio GM1 o BWC después de la dilución 1/10.

3) Hemos confirmado que el magnesio es requerido para el desarrollo de la competencia en el sistema de B. subtilis (NOTANI y SETLOW, 1974), mientras que los cationes manganeso, cobalto y zinc no presentan un efecto apreciable en dicho proceso.

4) Hemos demostrado que el calcio tiene un efecto desestabilizador en el desarrollo de la competencia de B. subtilis.

5) También hemos confirmado, de acuerdo con los resultados de BUITENWERF y VENEMA (1977) que el calcio no es requerido en el proceso de la transformación en el sistema de B. subtilis.

6) Concluimos que el EDTA produce una inhibición de la transformación, como se había descrito previamente, pero este efecto no puede ser revertido ni por calcio ni por manganeso. Esta inhibición sólo puede ser revertida en parte por la adición de magnesio, a diferencia de resultados previos (MORRISON, 1971) que sugerían una recuperación total de la transformabilidad.

7) El EDTA produce una alteración irreversible de los receptores específicos del DNA, presentes en la membrana tanto en células como en protoplastos y en vesículas membranosas y, como consecuencia, los niveles de DNA unidos se reducen considerablemente.

8) La eliminación del magnesio del medio de cultivo produce una inhibición del proceso de la transformación, pero permite la unión del DNA exógeno a la superficie celular en una forma accesible a la DNasa. El efecto inhibitorio de la ausencia del magnesio sobre la transformación es revertido por la adición de dicho catión al medio.

9) El DNA unido en ausencia de magnesio puede, al añadirse este catión, ser procesado por las células, incorporándose además el DNA libre en el medio. Consecuentemente, la carencia de magnesio no altera los receptores del DNA.

10) Es necesaria la presencia de magnesio para que el DNA transformante sufra una degradación exonucleolítica y para que pueda penetrar en el interior de las células. En ausencia de este catión el DNA conserva totalmente su actividad biológica.

11) Los receptores del DNA son moléculas diferentes de las exonucleasas encargadas de su incorporación o bien se trata de una misma molécula con dos actividades funcionales diferentes.

12) Hemos establecido un sistema experimental, mediante la eliminación del magnesio, que nos ha permitido separar la fase de unión del DNA exógeno de la penetración.

13) Los receptores específicos del DNA no se liberan al medio durante el proceso de obtención de protoplastos e incluso se produce un desenmascaramiento de receptores que están presentes en las células, pero que no son accesibles al DNA debido a la presencia de la pared bacteriana.

14) Hemos detectado una actividad endonucleolítica que requiere magnesio en los protoplastos. Dicha actividad enzimática provoca en el DNA transformante una pérdida de actividad biológica, debida a la producción de roturas principalmente monocatenarias. Dicha inactivación del DNA es mayor en cuanto a su actividad transformante que en cuanto a su capacidad de unión.

15) Hemos confirmado que el DNA unido a protoplastos no puede penetrar en el interior de éstos.

16) Los complejos pared-membrana obtenidos de células competentes llevan asociados a su membrana los receptores del DNA.

17) En las paredes bacterianas procedentes de células competentes no existen receptores específicos del DNA.

18) Los receptores específicos del DNA permanecen unidos a la membrana después de la obtención de vesículas. Nuestros niveles de unión de DNA a vesículas membranosas son superiores a los detectados por JOENJE y cols. (1975) y coinciden con los cálculos teóricos previstos por SETO y cols. (1975).

19) Una vez que el DNA de B. subtilis o de T*4 se ha unido a las células no puede ser desplazado por un exceso del mismo DNA (de B. subtilis o de T*4). Sin embargo, el DNA glucosilado de T4 es liberado de los receptores por este procedimiento.

20) Hemos comprobado que las células de B. subtilis no discriminan entre los DNAs homólogo y heterólogos en cuanto a su capacidad de unión.

21) El DNA del colifago T4, en el sistema de B. subtilis, se une a las células competentes. No obstante, la glucosilación del DNA de este fago provoca una disminución de la afinidad de dicho DNA por los receptores en células, pero no afecta su afinidad cuando se elimina la pared bacteriana.

22) Los protoplastos y vesículas membranosas aislados de cultivos competentes presentan dos niveles de saturación en su capacidad para unir DNA homólogo y un sólo nivel para los DNAs de los fagos T*4 y T4, mientras que las células exhiben un sólo nivel de saturación para los tres DNAs ensayados.

23) Parecen existir dos tipos de receptores del DNA en las células competentes. El primer tipo de receptores se encuentra accesible en las células y el segundo sólo puede ser detectado en protoplastos y vesículas.

24) El DNA de B. subtilis tiene mayor afinidad por el primer tipo de receptores, mientras que los DNAs de los fagos T*4 y T4 presentan igual afinidad por los dos tipos de receptores.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. ABDEL-MONEM, M., LAUPPE, H.F., KARTENBECK, J., DÜRWARD, H. y HOFFMAN-BERLING, H. (1977) Enzymatic unwinding of DNA.III. Mode of action of Escherichia coli DNA unwinding enzyme. J. Mol. Biol. 110, 667-685
2. AKRIGG, A. y AYAD, S.R. (1970) Studies on the competence-inducing factor of Bacillus subtilis. Biochem. J. 117, 397-407
3. AKRIGG, A., AYAD, S.R. y BLAMIRE, J. (1969) Uptake of DNA by competent bacteria. A possible mechanism. J. Theor. Biol. 24, 266-272
4. ALBERTS, B.M. y FREY, L. (1970) T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. Nature 227, 1313-1318
5. ANAGNOSTOPOULOS, C. y SPIZIZEN, J. (1961) Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81, 741-746
6. ANDO, T. (1966) A nuclease specific for heat-denatured DNA isolated from a product of Aspergillus oryzae. Biochim. Biophys. Acta 114, 158-168
7. ARCHER, L.J. (1973) Heat sensitivity of competent and precompetent cells of Bacillus subtilis. En: Bacterial transformation pag. 45-63 (Ed. L. Archer) Academic Press. London-New York.
8. ARCHER, L.J. y LANDMAN, O.E. (1969) Development of competence in thymine-starved Bacillus subtilis with chromosomes arrested at the terminus. J. Bacteriol. 97, 166-175
9. ARWERT, F. y VENEMA, G. (1973 a) Transformation in Bacillus subtilis: Fate of newly introduced transforming DNA. Mol. gen. Genet. 123, 185-198

10. ARWERT, F. y VENEMA, G. (1973 b) Evidence for a non-covalently bonded intermediate in recombination during transformation. En: Bacterial Transformation pag. 203-214 (Ed. L. Archer) Academic Press. London - New York.
11. AVERY, O.T., McLEOD, C.M. y McCARTY, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type.III. J. Exptl. Med. 79, 137-158
12. BACH, M.L. (1971) The transforming activity of sonicated Haemophilus influenzae DNA. Mol. gen. Genet. 110, 40-53
13. BARNHART, B.J. y HERRIOT, R.M. (1963) Penetration of deoxyribonucleic acid into Haemophilus influenzae. Biochim. Biophys. Acta 76, 25-39
14. BEATTIE, K.L. y SETLOW, J.K. (1970) Transformation between Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. J. Bacteriol. 104, 390-400
15. BETTINGER, G.E. y YOUNG, F.E. (1975) Transformation of Bacillus subtilis: transforming ability of deoxyribonucleic acid in lysates of L-forms or protoplasts. J. Bacteriol. 122 987-993
16. BINGHAM, D.P. y BARNHART, B.J. (1973). Inhibition of transformation by antibodies against competent Haemophilus influenzae. J. gen. Microbiol. 75, 249-258
17. BIRNBOIM, H.C. (1966) Cellular site in Bacillus subtilis of a nuclease which preferentially degrades single stranded nucleic acids. J. Bacteriol. 91, 1004-1011
18. BISWAS, G.D. y RAVIN, A.W. (1971) Heterospecific transformation in pneumococcus and Streptococcus. IV. Variations in hybrid DNA produced by recombination. Mol. gen. Genet. 110, 1-22
19. BODMER, W.F. (1965) Recombination and integration in Bacillus subtilis transformation: involvement of DNA shynthesis. J. Mol. Biol. 14, 534-557
20. BODMER, W.F. (1966) Integration of deoxyribonuclease-treated DNA in Bacillus subtilis transformation. J. gen. Physiol. 49, 233-258.

21. BODMER, W.F. y GANESAN, A.T. (1964) Biochemical and genetic studies of integration and recombination in Bacillus subtilis transformation. Genetics 50, 717-738
22. BODMER, W.F. y LAIRD, C.D. (1968) Molecular mechanism of recombination in Bacillus subtilis transformation. En: Symposium on replication and recombination of genetic material pag. 184-205. (Eds. W.I. Peacock y R.D. Brook) Australian Acad. Sci. Canberra.
23. BOTT, K.F. y WILSON, G.A. (1967) Development of competence in the Bacillus subtilis system. J. Bacteriol. 94, 562-570
24. BOTT, K.F. y WILSON, G.A. (1968) Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of Bacillus subtilis. Bacteriol. Rev. 32, 370-378
25. BRAUN, W. (1965) Bacterial Genetics. Philadelphia W.B. Saunders Co.
26. BRESLER, S.E., KRENEVA, R.A. y KUSHEV, V.V. (1968) Correction of molecular heterozygotes in the course of transformation. Mol. gen. Genet. 102, 257-268
27. BRILES, E.B. y TOMASZ, A. (1970) Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram-positive bacterium. J. Cell. Biol. 47, 786-790
28. BUITENWERF, J. (1977) Recombination in transformation of Bacillus subtilis. Tesis doctoral. Universidad de Groningen. Holanda
29. BUITENWERF, J. y VENEMA, G. (1977) Transformation in Bacillus subtilis. Biological and physical evidence for a novel DNA-intermediate in synchronously transforming cells. Mol. gen. Genet. 156, 145-155
30. BURKE, W.F. y SPIZIZEN, J. (1977) Isolation, characterization and activation of the magnesium-dependent endodeoxyribonuclease from Bacillus subtilis. Biochemistry 16, 403-410
31. CAHN, F.H. y FOX, M.S. (1968) Fractionation of transformable bacteria from competent cultures of Bacillus subtilis on Renografin gradients. J. Bacteriol. 95, 867-875

32. CASSUTO, E., LASH, T., SRIPRAKASH, K.S. y RADDING, C.M. (1971) Role of exonuclease and B-protein of phage λ in genetic recombination. V. Recombination of λ DNA in vitro Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1639-1643
33. CASSUTO, E. y RADDING, C.M. (1971) Mechanisms for the action of λ exonuclease in genetic recombination. Nature New Biol. 229, 13-16
34. CASTER, J.H. y GOODGAL, S.H. (1972) Competence mutant of Haemophilus influenzae with abnormal ratios of marker efficiencies in transformation. J. Bacteriol. 112, 492-502
35. CASTER, J.H., POSTEL, E.H. y GOODGAL, S.H. (1970) Competence mutants: isolation of transformation deficient strains of Haemophilus influenzae. Nature 227, 515-517
36. CATLIN, B.W. (1960) Transformation of Neisseria meningitidis by deoxyribonucleates from cells and from cultures slime. J. Bacteriol. 79, 579-590
37. CATLIN, B.W. (1964) Reciprocal genetic transformation between Neisseria catarrhalis and Moraxella nonliquefaciens J. gen. Microbiol. 37, 369-379
38. CATO, A. y GUILD, W.R. (1968) Transformation and DNA size. I. Activity of fragments of defined size and a fit to a random double cross-over model. J. Mol. Biol. 37, 157-178
39. CEGLOWSKI, P., FUCHS, P.G. y SOLTYK, A. (1975) Competitive inhibition of transformation in group H Streptococcus strain Challis by heterologous deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 124, 1621-1623
40. CHESTUKHIN, A.V., SHEMYAKIN, M.F., KALININA, N.A. y PROZOROV, A.A. (1972). Some properties from normal and rec⁻ mutant strain of Bacillus subtilis. FEBS Letters 24, 121-125
41. CHILTON, M.D. y MCCARTHY, B.J. (1969) Genetic and base sequence homologies in bacilli. Genetics. 62, 697-710
42. CIFERRI, O., BARLATI, S. y LEDERBERG, J. (1970) Uptake of synthetic polynucleotides by competent cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 104, 684-688

43. COSLOY, S.D. y OISHI, M. (1973) The nature of the transformation process in Escherichia coli K12. Mol. gen. Genet. 124, 1-10
44. CSANYI, V., KRAMER, M. y STRAUB, F.B. (1961) Citado por Notani y Setlow (1974) En: Mechanism of bacterial transformation and transfection. Progress in nucleic acid research and molecular biology 14, 99-120
45. DAVIDOFF-ABELSON, R. y DUBNAU, D. (1971) Fate of transforming DNA after uptake by competent Bacillus subtilis: failure of donor DNA to replicate in a recombination-deficient mutant. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1070-1074
46. DAVIDOFF-ABELSON, R. y DUBNAU, D. (1973 a) Conditions affecting the isolation from transformed cells of Bacillus subtilis of high-molecular-weight single-stranded deoxyribonucleic acid of donor origin. J. Bacteriol. 116, 146-153
47. DAVIDOFF-ABELSON, R. y DUBNAU, D. (1973 b) Kinetic analysis of the products of donor deoxyribonucleate in transformed cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 116, 154-162
48. DISHMAN, B.R. (1972) The role of molecular configuration in transfection of Bacillus subtilis with bacteriophage DNA. Tesis doctoral Universidad de Texas. USA.
49. DOBRZANSKI, W.T., OSOWIECKI, H. y JAGIELSKI, M.A. (1968) Observations on intergeneric transformation between staphylococci and streptococci. J. gen. Microbiol. 53, 187-196
50. DOOLEY, D.C., HADDEN, C.T. y NESTER, E.W. (1971) Macromolecular synthesis in Bacillus subtilis during development of the competence state. J. Bacteriol. 108, 668-679
51. DOOLEY, D.C. y NESTER, E.W. (1973) Deoxyribonucleic acid-membrane complexes in the Bacillus subtilis transformation system. J. Bacteriol. 114, 711-722
52. DUBNAU, D. y CIRIGLIANO, C. (1972) Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis. III. Formation and properties of products isolated from transformed cells which are derived entirely from donor DNA. J. Mol. Biol. 64, 9-29

53. DUBNAU, D. y CIRIGLIANO, C. (1974) Genetic characterization of recombination-deficient mutants of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 117, 488-493
54. DUBNAU, D. y DAVIDOFF-ABELSON, R. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. J. Mol. Biol. 56, 209-221
55. DUBNAU, D., DAVIDOFF-ABELSON, R., SCHER, B. y CIRIGLIANO, C. (1973). Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis. Formation and properties of the donor-recipient complex. J. Bacteriol. 114, 273-286
56. DUBNAU, D., SMITH, I., MORELL, P. y MARMUR, J. (1965) Gene conservation in Bacillus species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 491-498
57. EBERLE, H. y LARK, E.G. (1967) Chromosome replication in Bacillus subtilis cultures growing at different rates. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 95-101
58. EISENSTADT, E., LANGE, R. y WILLECK, K. (1975) Competent Bacillus subtilis cultures synthesize a denatured DNA binding activity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 323-327
59. ELLWOOD, D.C. (1970) The wall content and composition of Bacillus subtilis var. niger grown in a chemostat. Biochem. J. 118, 367-373
60. EPHRATI-ELIZUR, E. (1965) Development of competence for transformation experiments in an overnight culture of germinating spores of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 90, 550-551
61. EPHRATI-ELIZUR, E. (1968) Spontaneous transformation in Bacillus subtilis. Genet. Res. 11, 83-96
62. EPHRUSSI-TAYLOR, H. y FREED, B.A. (1964) Incorporation of thymidine and amino acids into deoxyribonucleic acid and acid-insoluble cell structures in pneumococcal cultures synchronized for competence to transform. J. Bacteriol. 87 1211-1215

63. EPSTEIN, H.T. (1971) X-ray study of competence development in Bacillus subtilis. Mol. gen. Genet. 110, 327-331
64. ERICKSON, R.J. (1970) New ideas and data on competence and DNA entry in transformation of Bacillus subtilis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 53, 149-199
65. ERICKSON, R.J. y COPELAND, J.C. (1972) Structure and replication of chromosomes in competent cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 109, 1075-1084
66. ERICKSON, R.J., YOUNG, F.E. y BRAUN, W. (1969) Studies on the binding of rabbit gamma-globulin by competent Bacillus subtilis cultures. J. Bacteriol. 99, 125-131
67. ESPINOSA, M. (1975) Recientes avances en el estudio de la competencia en Bacillus subtilis. En: Aspectos actuales en la transmisión de información genética pag. 177-195 (Ed. A. Portolés y F. Baquero) S.E.M. Madrid
68. ESPINOSA, M., GARCIA, E. y FERNAUD, J.M. (1977) Mathematical approach to the competence development in Bacillus subtilis J. Theor. Biol. 67, 155-174
69. ESPINOSA, M., LOPEZ, R., PEREZ UREÑA, M.T., GARCIA, E. y PORTOLES, A. (1976) Competence in continuous cultures of Bacillus subtilis: inhibition by arginine and reversal of the inhibition by Mn^{2+} . J. gen. Microbiol. 97, 291-301
70. EVANS, A.H. (1964) Introduction of specific drug resistance properties by purified RNA-containing fractions from pneumococcus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 1442-1449
71. FARMER, J.L. y ROTHMAN, F. (1965) Transformable thymine-requiring mutant of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89, 262-263
72. FITZ-JAMES, P.C. (1964) Fate of mesosomes of Bacillus megaterium during protoplasting. J. Bacteriol. 87, 1483-1491
73. FÖLDES, J. y TRAUTNER, T.A. (1964) Infectious deoxyribonucleic acid from a newly isolated Bacillus subtilis phage. Z. Vererbungsl. 95, 57-65
74. FOLSOME, C.E. (1968) Deoxyribonucleate binding and transformation in Mycoplasma laidlawii. J. gen. Microbiol. 50, 43-53

75. FORNILLI, S. y FOX, M.S. (1977) Electron microscope visualization of the products of Bacillus subtilis transformation. J. Mol. Biol. 113, 181-191
76. FOX, M.S. y ALLEN, M.K. (1964) On the mechanism of deoxyribonucleate integration in pneumococcal transformation. Prot. Nat. Acad. Sci. USA 52, 412-419
77. FOX, M.S. y HOTCHKISS, R.D. (1957) Initiation of bacterial transformation. Nature 179, 1322-1325
78. FOX, M.S. y HOTCHKISS, R.D. (1960) Fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. I. Nature 187, 1002-1004
79. GANESAN, A.T. (1967) Particule fractions in macromolecular synthesis and genetic transformation. En: Organizational biosynthesis pag. 19-47 (Ed. H.J. Vogel, J.O. Lampen y V. Brison) Academic Press. New York.
80. GARCIA, E. (1974) Características fisiológicas del estado de competencia en sistemas transfectantes de Bacillus subtilis. Tesis doctoral. Universidad de Madrid
81. GEL'MAN, N.S., LUKOYANOVA, M.A. y OSTROVSKII, D.N. (1975) Bacterial membranes and the respiratory chain. En: Biomembranes, vol. 6 (ED. N.S. Gel'man, M.A. Lukoyanova y D.N. Ostrovskii) Plenum Press, New York, London
82. GERMAIN, G.R. y ANDERSON, D.L. (1966) Binding of homologous polymerized deoxyribonucleic acid in Streptomyces griseus J. Bacteriol 92, 662-667
83. GHEI, O.K. y LACKS, S.A. (1967) Recovery of donor deoxyribonucleic acid marker activity from eclipse in pneumococcal transformation. J. Bacteriol. 93, 816-829
84. GOODGAL, S.H. y HERRIOTT, R.M. (1957) Studies on transformation of Haemophilus influenzae. En: Chemical basis of heredity. pag. 336-340 (ED. W. McElroy y B. Glass). John Hopkins Univ. Press. Baltimore Maryland.
85. GREEN, D.M. y URBAN, M.I. (1972) Recombination and transfection mapping of cistron five of bacteriophage SP82G Genetics 70, 187-203

86. GRETH, M.L. y CHEVALLIER, M.R. (1973) Studies on ATP-dependent deoxyribonuclease of Haemophilus influenzae: involvement of the enzyme in the transformation process. Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 1-8
87. GROMKOVA, R. y GOODGAL, S.H. (1972) Action of Haemophilus endodeoxyribonuclease on biologically active deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 109, 987-992
88. GUTHRIE, G.D. y SINSHEIMER, R.L. (1960) The infection of protoplasts of Escherichia coli by subviral particles of bacteriophage ϕ X174. J. Mol. Biol. 2, 297-305
89. HADDEN, C. y NESTER, E.W. (1968) Purification of competent cells in the Bacillus subtilis transformation system. J. Bacteriol. 95, 876-885
90. HAMPTON, M.L. y ARCHER, L.J. (1976) Binding of exogenous deoxyribonucleic acid to membrane fractions from Bacillus subtilis. En: Microbiology 1976. pag. 101-104. American Society for Microbiology
91. HANSON, R.S. y COX, D.P. (1967) Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. J. Bacteriol. 93, 1777-1787
92. HARRIS, W.J. y BARR, G.C. (1969) Some properties of deoxyribonucleic acid in competent Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 39, 245-255
93. HARRIS, W.J. y BARR, G.C. (1971 a) Structural features in competent Bacillus subtilis. Molec. gen. Genet. 113, 316-330
94. HARRIS, W.J. y BARR, G.C. (1971 b) Mechanism of transformation in Bacillus subtilis. Molec. gen. Genet. 113, 331-344
95. HASELTINE, F.P. y FOX, M.S. (1971) Bacterial inactivation of transforming deoxyribonucleate. J. Bacteriol. 107, 889-899
96. HIROKAWA, H. e IKEDA, Y. (1966) Genetic recombination of transforming deoxyribonucleic acid molecules with the recipient genomes and among themselves in protoplast of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 92, 454-463

97. HIROKAWA, H., TRAUTNER, T.A. y LÜDER, G. (1977) On the dose response in Bacillus subtilis transfection. Involvement of aggregates in Ø 29 transfection. Mol. gen. Genet. 156, 263-266
98. HOBBY, G.L., MEYER, K. y CHAFEE, E. (1942) Observations on the mechanism of action of penicillin. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 50, 281-285
99. HOLLOMAN, W.K., WIEGAND, R., HOESSLI, C. y RADDING, C.M. (1975) Uptake of homologous single-stranded fragments by superhelical deoxyribonucleic acid: a possible mechanism for initiation of genetic recombination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2394-2398
100. HOLTJE, J.V. y TOMASZ, A. (1976) Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. J. Biol. Chem. 251, 4199-4207
101. HORNE, D., PLOTCH, S. y TOMASZ, A. (1977) Cell surface components implicated as attachment sites for the pneumococcal competence activator. En: Modern trends in bacterial transformation and transfection. pag. 11-34 (Eds. A. Portolés, R. López y M. Espinosa) North Holland Publish Co. Amsterdam.
102. HORVATH, S. (1968) Competence in Bacillus subtilis transformation system. J. gen. Microbiol. 51, 85-95
103. HOTCHKISS, R.D. y GABOR, M. (1970) Bacterial transformation with special reference to recombination process. Ann. Rev. Genet. 4, 193-224
104. IVARIE, R.D. y PENE, J.J. (1970) Association of the Bacillus subtilis chromosome with the cell membrane: resolution of free and bound deoxyribonucleic acid on renografine gradient. J. Bacteriol. 104, 839-850
105. JAVOR, G.T. y TOMASZ, A. (1968) An autoradiographic study of genetic transformation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1216-1222
106. JENSEN, R.A. y HAAS, F.L. (1963 a) Electrokinetics and cell physiology. I. Experimental basis for electrokinetic cell studies. J. Bacteriol. 86, 73-78
107. JENSEN, R.A. y HAAS, F.L. (1963 b) Electrokinetics and cell physiology. II. Relationship of surface charge to onset of bacterial competence for genetic transformation. J. Bacteriol. 86, 79-86

108. JOENJE, H. (1975) Competence and competence development in Bacillus subtilis. Tesis doctoral Universidad de Groningen. Holanda
109. JOENJE, H., GRUBER, M. y VENEMA, G. (1972) Stimulation of the development of competence by culture fluids in Bacillus subtilis transformation. Biochim. Biophys. Acta 262, 189-199
110. JOENJE, H., KONINGS, W.N. y VENEMA, G. (1974) Interactions between exogenous deoxyribonucleic acid and membrane vesicles isolated from Bacillus subtilis 168. J. Bacteriol. 119, 784-794
111. JOENJE, H., KONINGS, W.N. y VENEMA, G. (1975) Interactions between exogenous deoxyribonucleic acid and membrane vesicles isolated from competent and noncompetent Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 121, 771-776
112. JOENJE, H. y VENEMA, G. (1975) Different nuclease activities in competent and noncompetent Bacillus subtilis J. Bacteriol. 122, 25-33
113. JONES, D. y SNEATH, P.H.A. (1970) Genetic transfer and bacterial taxonomy. Bacteriol. Rev. 34, 40-81
114. KABACK, H.R. (1970) Preparation and characterization of bacterial membranes. En: Methods in enzymology vol.22 pag. 99-120 (Ed. W.B. Jakoby) Academic Press, New York
115. KAISER, A.D. y HOGNESS, D.S. (1960) The transformation of Escherichia coli with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage λ dg. J. Mol. Biol. 2, 392-415
116. KAMMEN, H.O., BELOFF, R.H. y CANELLAKIS, E.S. (1966) Transformation in Bacillus subtilis. I. Role of amino acids in stabilization of transformats. Biochim. Biophys. Acta 123, 39-55
117. KELLY, M.S. (1967) The cause of instability of linkage in transformation of Bacillus subtilis Mol. gen. Genet. 99, 350-361
118. KELNER, A. (1964) Correlation between genetic transformability and nonphotoreactibility in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 87, 1295-1303

119. KIRTIKAR , M.W. y DUERKSEN, J.D. (1968 a). A penicillinase specific ribonucleic acid component from Bacillus cereus. I. Ribonucleic acid extraction and definition of the in vivo test system. Biochem 7, 1172-1182
120. KIRTIKAR, M.W. y DUERKSEN, J.D. (1968 b) A penicillinase specific ribonucleic acid component from Bacillus cereus . II. Partial characterization of the active component. Biochem. 7, 1183-1193
121. KOHOUTOVA, M. (1967) Role of deoxyribonuclease in genetic transformation. II. RNA as an inhibitor of deoxyribonuclease activity in pneumococcal strains. Folia Microbiol. 12, 316-322
122. KOOISTRA, J. y VENEMA, G. (1967) The level of integration of donor deoxyribonucleic acid in transformation of Haemophilus influenzae. Genetica 38, 59-60
123. KOOISTRA, J. y VENEMA, G. (1973) Poor transformability with nov^r and ery^r donor deoxyribonucleic acid of some mitomycin-C-sensitive strains of Haemophilus influenzae. Mutation Research 22, 313-326
124. LACKS, S. (1970) Mutants of Diplococcus pneumoniae that lack deoxyribonuclease and other activities possibly pertinent to genetic transformation. J. Bacteriol. 101, 373-383
125. LACKS, S. (1977) Binding and entry of deoxyribonucleic acid in pneumococcal transformation. En: Modern trends in bacterial transformation and transfection. pag. 35-44 (Eds. A. Portolés, R. López y M. Espinosa). North Holland Publish Co. Amsterdam
126. LACKS, S. y GREENBERG, B. (1973) Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in genetic transformation of Diplococcus pneumoniae J. Bacteriol. 114, 152-163
127. LACKS, S. y GREENBERG, B. (1976) Single-strand breakage on binding of deoxyribonucleic acid to cells in the genetic transformation of Diplococcus pneumoniae. J. Mol. Biol. 101, 255-275

128. LACKS, S., GREENBERG, B. y CARLSON, K. (1967) Fate of donor deoxyribonucleic acid in pneumococcal transformation. J. Mol Biol. 29, 327-347
129. LACKS, S., GREENBERG, B. y NEUBERGER, M. (1975) Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of Diplococcus pneumoniae. J. Bacteriol. 123, 222-232
130. LACKS, S. y HOTCHKISS, R.D. (1960) Formation of amylomaltase after genetic transformation of pneumococcus. Biochim. Biophys. Acta 45, 155-163
131. LACKS, S. y NEUBERGER, M. (1975) Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of Diplococcus pneumoniae. J. Bacteriol. 124, 1321-1329
132. LARK, K.G. (1966) Regulation of chromosome replication and segregation in bacteria. Bacteriol. Rev. 30, 3-32
133. LeCLERC, J.E. y SETLOW, J.K. (1975) Single-strand regions in the deoxyribonucleic acid of competent Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 122, 1091-1102
134. LEE, C.S., DAVIS, R.W. y DAVIDSON, N. (1970) A physical study by electron microscopy of the terminally repetitive, circularly permuted deoxyribonucleic acid from the coliphage particules of Escherichia coli 15. J. Mol. Biol. 48, 1-22
135. LEONARD, C.G. y COLE, R.M. (1972) Purification and properties of streptococcal competence factor isolated from chemically defined medium. J. Bacteriol. 110, 273-280
136. LERMAN, L.S. y TOLMACH, L.J. (1957) Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in pneumococcus. Biochim. Biophys. Acta 26, 68-82
137. LEVINE, J.S. y STRAUSS, N. (1965) Lag period characterizing the entry of transforming deoxyribonucleic acid into Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89, 281-287
138. LOPEZ, P. (1975) Estudio de la regulación de la competencia de Bacillus subtilis en quimostato. Memoria de Licenciatura Universidad de Madrid.

139. LOPEZ, P., PEREZ UREÑA, M.T., ESPINOSA, M. y PORTOLES, A. (1978) Further studies on the competence development in exponentially growing cultures of B. subtilis. Zentr. Bakt. (en prensa)
140. LOPEZ, R. (1975) Aportaciones recientes en el sistema de transformación genética de "Diplococcus pneumoniae". En: Aspectos actuales en la transformación de información genética de microorganismos pag. 197-221 (Ed. A. Portolés y F. Baquero) S.M.E. Madrid.
141. LOPEZ, R., PEREZ UREÑA, M.T., ESPINOSA, M. y PORTOLES, A. (1972) The effect of penicillin on competence in Bacillus subtilis cultures growing in chemostat at different doubling times. Arch. Mikrobiol. 82, 206-212
142. LOPEZ, R., TAPIA, A. y PORTOLES, A. (1975) The influence of glutamic acid and arginine on the competence of Bacillus subtilis growing in a chemostat. Mol. gen. Genet. 136, 87-94
143. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
144. MARMUR, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxy-ribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208-218
145. MAZZA, C., FORTUNATO, A., FERRARI, E., CANOSI, U., FALASCHI, A. y POLSINELLI, H. (1975) Genetic and enzymatic studies on the recombination process in Bacillus subtilis. Mol. gen. Genet. 136, 9-30
146. MCCARTHY, C. y NESTER, E.W. (1967) Macromolecular synthesis in newly transformed cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol 94, 131-140
147. MCCARTHY, C. y NESTER, E.W. (1969) Heat-sensitive step in deoxyribonucleic acid-mediated transformation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 97, 162-165
148. MCCARTY, M., TAYLOR, H.E. y AVERY, O.T. (1946) Biochemical studies of enviromental factors essential in transformation of pneumococcal types. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 177-183

149. McDONALD, W.C. (1971) Initial temperature sensitivity of streptomycin-dependent and tryptophan transformant of Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 17, 823-828
150. MIAO, R. y GUILD, W.R. (1970) Competent Diplococcus pneumoniae accept both single- and double-stranded deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101, 361-364
151. MILLER, D.H. y HUANG, P.C. (1972) Identification of competence-repressing factor during log-phase growth of Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 109, 560-566
152. MILLER, I.L. y LANDMAN, O.E. (1963) Obstacles to transformation presented by bacterial anatomy. Bacteriol. Proc. pag. 34
153. MILLER, I.L. y LANDMAN, O.E. (1965) On the mode of entry of transforming DNA into Bacillus subtilis. En: The physiology of gene and mutation expresion pag. 187-194 (Eds. M. Kohoutova y J. Hubacek) Prague Academia
154. MILLER, F.L., PALMER, C.D. y LANDMAN, O.E. (1972) Comparison of deoxyribonucleic acid uptake and marker integration in bacilli and protoplasts of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 110, 661-666
155. MORRISON, D.A. (1971) Early intermediate state of transforming deoxyribonucleic acid during uptake by Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 108, 38-44
156. MORRISON, D.A. (1977) Transformation in pneumococcus: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. J. Bacteriol. 132, 576-583
157. MORRISON, D.A. y GUILD, W.R. (1973) Breakage prior to entry of donor DNA in pneumococcus transformation. Biochim. Biophys. Acta 299, 545-556
158. MOSELEY, B.E.B. y SETLOW, J.K. (1968) Transformation in Micrococcus radiodurans and the ultraviolet sensitivity of its transforming DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 176-183
159. NESTER, E.W. (1964) Penicillin resistance of competent cell in deoxyribonucleic acid transformation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 87, 867-875

160. NESTER, E.W. y STOCKER, B.A.D. (1963) Byosynthesis latency in early stages of deoxyribonucleic acid transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 86, 785-796
161. NICKEL, L. y GOODGAL, S.H. (1964) Effect of interspecific transformation on linkage relationships of markers in Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. J. Bacteriol. 88, 1538-1544
162. NOTANI, N.K. y GOODGAL, S.H. (1966) On the nature of re-combinants formed during transformation in Haemophilus influenzae. J. gen. Physiol. 49, 197-209
163. NOTANI, N.K. y SETLOW, J.K. (1972) Molecular events accompanying the fixation of genetic information in Haemophilus heterospecific transformation. J. Bacteriol. 112, 751-760
164. NOTANI, N.K. y SETLOW, J.K. (1974) Mechanism of bacterial transformation and transfection. En: Progress in nucleic acid research and molecular biology. vol. 14 pag. 99-120 (Ed. W.E. Cohn). Academic Press. New York.
165. NOTANI, N.K. y SETLOW, J.K., JOSHI, V.R. y ALLISON, D.P. (1972) Molecular basis for the transformation defects in mutants of Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 110, 1171-1180.
166. OISHI, M. y COSLOY, S.D. (1972) The genetic and biochemical basis of the transformability of Escherichia coli K12 Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1568-1572
167. OISHI, M. e IRBE, R.M. (1977) Circular chromosomes and genetic transformation in Escherichia coli. En: Modern trends in bacterial transformation and transfection. pag. 121-134 (Eds. A. Portolés, R. López y M. Espinosa) North Holland Publish. Co. Amsterdam.
168. OTAKA, E., TERAOKA, H., TAMAKI, M., TANAKA, K. y OSAWA, S. (1970) Ribosomes from erythromycin-resistant mutants of Escherichia coli Q23. J. Mol. Biol. 48, 499-510
169. OTTOLENGHI, E. y HOTCHKISS, R.D. (1962) Release of genetic transforming DNA from pneumococcal cultures during growth and desintegration. J. Exp. Med. 116, 491-519

170. PAKULA, R. (1961) Interspecific transformation as a means of determining genetic relationships in streptococci. *Acta Microbiol. Polon.* 10, 249-254
171. PAKULA, R., CYBULSKA, J. y WALCZAK, W. (1963) The effect of environmental factors on transformability of a streptococcus. *Acta Microbiol. Polon.* 12, 245-258
172. PAKULA, R., PIECHOWSKA, M., BANKOWSKA, E. y WALCZAK, W. (1962) A characteristic of DNA mediated transformation systems of two streptococcal strains. *Acta Microbiol. Polon.* 11, 205-222
173. PAKULA, R., RAY, P. y SPENCER, L.R. (1970) Some characteristics of streptococci competent for uptake of deoxyribonucleic acid. *Can. J. Microbiol.* 16, 345-350
174. PASTAN, I. y PERLMAN, R. (1970) Cyclic adenosine-monophosphate in bacteria. *Science* 169, 339-344
175. PEDRINI, A.M., GEROLDI, D., FALASCHI, A. (1972) Nalidixic acid does not inhibit bacterial transformation. *Mol. gen. Genet.* 116, 91-94
176. PENE, J.J. y ROMIG, W.R. (1964) On the mechanism of genetic recombination in transforming Bacillus subtilis. *J. Mol. Biol.* 9, 236-245
177. PERRY, D. y SLADE, H.D. (1963) Optimal conditions for the transformation of streptococci. *J. Bacteriol.* 85, 636-642
178. PERRY, D. y SLADE, H.D. (1966) Effect of filtrates from transformable and nontransformable streptococci on the transformation of streptococci. *J. Bacteriol.* 91, 2216-2222
179. PIECHOWSKA, M. y FOX, M.S. (1971) Fate of transforming deoxyribonucleate in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 108, 680-689
180. PIECHOWSKA, M., PIWNICKA, M. y VENEMA, G. (1977) Some characteristics of endonuclease S1-sensitive DNA isolated from Bacillus subtilis. En: *Modern trends in bacterial transformation and transfección* pag. 135-142. (Eds. A. Portolés, R. López, M. Espinosa) North Holland Publish Co. Amsterdam.

181. PIECHOWSKA, M. y SHUGAR, D. (1967) Streptococcal group H transforming system with reproducible high transformation yields. Acta Biochim. Polon. 14, 277-282
182. PIECHOWSKA, M. , SOLTYK, A. y SHUGAR, D. (1975) Fate of heterologous deoxyribonucleic acid in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 122, 610-622
183. PIERSON, D.L., WEPPNER, W.A. y LEACH, F.R. (1972) The effect of osmotic shocking upon Bacillus subtilis transformation. Can. J. Microbiol. 18, 1405-1415
184. POPOWSKY, J. y VENEMA, G. (1977) citado por Buitenwerf (1977) En: Tesis doctoral Universidad de Groningen. Holanda.
185. PORTOLES, A., ESPINOSA, M., LOPEZ, R., PEREZ UREÑA, M.T., GARCIA, E. y LOPEZ, P. (1977 a) Competence of Bacillus subtilis in chemostat. En: Modern trend in bacterial transformation and transfection. pags. 45-54 (Eds. A. Portolés, R. López y M. Espinosa) North-Holland Publish Co. Amsterdam.
186. PORTOLES, A., GARCIA, E., PEREZ UREÑA, M.T. y ESPINOSA, M. (1975) Estimulación de la competencia en Bacillus subtilis y su posible inhibición a distintos niveles celulares. Microbiol. Españ. 28, 129-141
187. PORTOLES, A., LOPEZ, R., PEREZ UREÑA, M.T. y ESPINOSA, M. (1977 b) Transformación en procariontes. En: Genética Microbiana pag. 103-133. (Ed. E. Cerdá) Alhambra. Madrid.
188. POSTEL, E.W. y GOODGAL, S.H. (1967) Further studies on transformation with single-stranded DNA of Haemophilus influenzae . J. Mol. Biol. 28, 247-259
189. POSTEL, E.H. y GOODGAL, S.H. (1972) Competence mutants. II. Physical and biological fate of donor transforming deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 109, 292-297
190. PROZOROV, A.A. (1965) The effect of egg-white lysozyme on the permeability of cells of Bacillus subtilis to transforming DNA. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, Ofd. 160, 472-474
191. RADDING, C.M. (1973) Molecular mechanisms in genetic recombination. Ann. Rev. Genet. 7, 87-111

192. RAINA, J.L. y RAVIN, A.W. (1977) The fate of transforming DNA bound to competent Streptococcus sanguis. En: Modern trends in bacterial transformation and transfection pag. 14-148 (Ed. A. Portolés, R. López, M. Espinosa) North Holland Publish Co. Amsterdam.
193. RAMOS, F., WIAME, J.M., WYNANTS, J. y BECHET, J. (1962) Effect of mutant of Bacillus subtilis on the specific transport of aconitase and dicarboxylic acid. Nature 193, 70-71
194. RANDOLPH, M.L. y SETLOW, J.K. (1972) Manganese-resistant mutants of Escherichia coli: physiological and genetic studies. J. Bacteriol. 111, 186-195
195. RANHAND, J.M. (1973) Autolytic activity and its association with the development of competence in group H streptococci. J. Bacteriol. 115, 607-614
196. RANHAND, J.M. (1974) Inhibition of transformation by sodium metaperiodate in Streptococcus sanguis (Wicky): Demonstration that deoxyribonucleic acid binding sites contain amino acids. J. Bacteriol. 118, 1192-1193
197. RANHAND, J.M., LEONARD, C.G. y COLE, R.M. (1971) Autolytic activity associated with competent group H streptococci. J. Bacteriol. 106, 257-268
198. RANHAND, J.M. y LICHSTEIN, H.C. (1969) Effect of selected antibiotics and others inhibitors on competence development in Haemophilus influenzae. J. gen. Microbiol. 55, 37-43
199. RAVIN, A.W. (1961) The genetics of transformation. Advanc. Genet. 10, 61-163
200. RAVIN, A.W. y CHEN, K.C. (1967) Heterospecific transformation of pneumococcus and Streptococcus. III. Reduction of linkage. Genetics. 57, 851-864
201. RAVIN, A.W. y De SA, J.D.H. (1964) Genetic linkage of mutational sites affecting similar characters in pneumococcus and Streptococcus. J. Bacteriol. 87, 86-96
202. RAVIN, A.W. y MA, M. (1972) Specific effects of heating transformable streptococci on their ability to discriminate between homospecific, heterospecific and hybrid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 109, 616-625

203. RYTER, A. y LANDMAN, O.E. (1964) Electron microscope study of the relationship between mesosome loss and the stable L state (or protoplast state) in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 88, 457-467
204. SCHAEFFER, P. (1958) Interspecific reactions in bacterial transformation. Symp. Soc. Exptl. Biol. 12, 60-74
205. SCHAEFFER, P., IONESCO, H., RYTER, A. y BALASSA, G. (1965) La sporulation de Bacillus subtilis: étude génétique et physiologique. En: Mechanismes de regulation chez les microorganismes. vol. 124, p. 553-563 Coll. Int. Centre natn. Rech. Sci. Paris.
206. SCHER, B. y DUBNAU, D. (1973) A manganese-stimulated endonuclease from Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 595-602
207. SCHER, B. y DUBNAU, D. (1976) Purification and properties of a manganese-stimulated from Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 126, 429-438
208. SCHMID, R.W. y REILLEY, C.N. (1957) New complexon for titration of calcium in the presence of magnesium. Anal. Chem. 29, 264-268
209. SCHNEIDER, W.C. (1957) Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology vol. 3, pag. 680-684 (Eds. S.P. Colowick y N.A. Kaplan) Academic Press. New York.
210. SETLOW, J.K., BOLING, M.E., ALLISON, D.P. y BEATTIE, K.L. (1973) Relationship between prophage induction and transformation in Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 115, 153-161
211. SETLOW, J.K., BOLING, M.E., BEATTIE, K.L. y KIMBALL, R.F. (1972) A complex of recombination and repair genes in Haemophilus influenzae. J. Mol. Biol. 68, 361-378
212. SETLOW, J.K., BOLING, M.E. y BOLLUM, F.J. (1965) The chemical nature of photoreactivable lesions in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1430-1436
213. SETO, H., LOPEZ, R. y TOMASZ, A. (1975) Cell surface-located deoxyribonucleic acid receptors in transformable pneumococci. J. Bacteriol. 122, 1339-1350

214. SETO, H. y TOMASZ, A. (1974) Early stages in DNA binding and uptake during genetic transformation of pneumococci. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1493-1498
215. SETO, H. y TOMASZ, A. (1975 a) Protoplasts formation and leakage of intramembrane cell components: induction by the competence activator substance of pneumococci. J. Bacteriol. 121, 344-353
216. SETO, H. y TOMASZ, A. (1975 b) Selective release by a deoxyribonucleic acid-binding factor from the surface of competence pneumococci. J. Bacteriol. 124, 969-976
217. SETO, H. y TOMASZ, A. (1976) Calcium-requiring step in the uptake of deoxyribonucleic acid molecules through the surface of competent pneumococci. J. Bacteriol. 126, 1113-1118
218. SINGH, R.N. (1972) Number of deoxyribonucleic acid uptake sites in competent cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 110, 266-272
219. SINGH, R.N. y PITALE, M.P. (1967) Enrichment of Bacillus subtilis transformant by zonal centrifugation. Nature 213, 1262-1263
220. SINGH, R.N. y PITALE, M.P. (1968) Competence and deoxyribonucleic acid uptake in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 95, 864-866
221. SJÖSTRÖM, J.E., LINDBERG, M. y PHILIPSON, L. (1972) Transfection of Staphylococcus aureus with bacteriophage deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 109, 285-291
222. SMITH, M.O. y WILCOX, K.W. (1970) A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. I. Purification and general properties. J. Mol. Biol. 51, 379-391
223. SOLTYK, A., SHUGAR, D. y PIECHOWSKA, M. (1975) Heterologous deoxyribonucleic acid in competent Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 124, 1429-1438
224. SPATZ, H.Ch. y TRAUTNER, T.A. (1971) The role of recombination in transfection of Bacillus subtilis. Molec. gen. Genet. 113, 174-190
225. SPENCER, H.T. y HERRIOT, R.M. (1965) Development of competence of Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 90, 901-920

226. SPIZIZEN, J., REILLY, B.E. y EVANS, A.H. (1966) Microbial transformation and transfection. Ann. Rev. Microbiol. 20 371-400
227. SROGL, M. (1966) Intraspecific transformation in Bacillus subtilis. Folia Microbiol. 11, 39-42
228. STACHURA, I., MCKINLEY, F.W., LEIDY, G. y ALEXANDER, H.E. (1968) Citado por Notani y Setlow (1974) En: Mechanism of bacterial transformation and transfection. Progress in nucleic acid research and molecular biology 14, 99-120
229. STRATLING, W. y KNIPPERS, R. (1971) Deoxyribonucleic acid synthesis in isolated DNA-membrane complexes. J. Mol. Biol. 61, 471-487.
230. STREIPS, U.N. y YOUNG, F.E. (1971) Mode of action of the competence-inducing factor of Bacillus stearothermophilus J. Bacteriol. 106, 865-875
231. STUY, J.H. (1965) Fate of transforming DNA in the Haemophilus influenzae transformation system. J. Mol. Biol. 13, 554-570
232. STUY, J.H. y STERN, D. (1964) The kinetics of DNA uptake by Haemophilus influenzae. J. gen. Microbiol. 35, 391-400
233. SZULMAJSTER, J. y HANSON, R.S. (1965) Physiological control of sporulation in Bacillus subtilis. En: Spores III pag. 162-173 (Eds. L.L. Campbell y H.O. Halvorson). American society for Microbiology. Ann. Arbor. Michigan.
234. SZYBALSKY, W. y OPARA-KUBINSKA, Z. (1966) Physico-chemical and biological properties of genetic markers in transforming DNA. Symp. Biol. Hung. 6, 43-56
235. TAMIR, H. y GILVARG, C. (1966) Density gradient centrifugation for the separation of sporulating form of bacteria J. Biol. Chem. 241, 1085-1090
236. TEITELBAUM, H. y ENGLANDER, S.W. (1975) Open states in native polynucleotides. I. Hydrogen-exchange study of adenine-containing double helix. J. Mol. Biol. 92, 55-78
237. TEVETHIA, M.J. y CAUDILL, C.P. (1971) Relationship between competence for transformation of Bacillus subtilis with native and single-stranded deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 106, 808-811

238. TEVETHIA, M.J. y MANDEL, M. (1970) Nature of the ethylenediaminetetraacetic acid requirement for transformation of Bacillus subtilis with single-stranded deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101, 844-850
239. TEVETHIA, M.J. y MANDEL, M. (1971) Effects of pH on transformation of Bacillus subtilis with single-stranded deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 106, 802-807
240. TICHY, P. (1972) De novo protein synthesis during the development of competence in Bacillus subtilis. Folia Microbiol. 17, 213-220
241. TICHY, P. y LANDMAN, O.E. (1969) Transformation in quasi-spheroplasts of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 97, 42-51
242. TOMASZ, A. (1966) Model for the mechanisms controlling the expression of the competent state in pneumococcus cultures. J. Bacteriol. 91, 1050-1061
243. TOMASZ, A. (1968) Biosynthetic capacities and permeability properties of Diplococcus pneumoniae in the competent state. Bacteriol. Proc. pag. 59
244. TOMASZ, A. (1969) Some aspects of the competence state in genetic transformation. Ann. Rev. Genet. 3, 217-232
245. TOMASZ, A. (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. J. Bacteriol. 101, 860-871
246. TOMASZ, A. (1973 a). The binding of polydeoxyribonucleotides to the surface of competent pneumococci. En: Bacterial transformation. pag. 81-88. (Ed. L.J. Archer) Academic Press New York.
247. TOMASZ, A. (1973 b) Interactions between cells and DNA molecules: the nature of the competent state. En: Bacterial membranes and walls pag. 332-352 (Ed. L. Leive). M. Dekker New York.
248. TOMASZ, A. y BEISER, S.M. (1965) Relationship between the competence antigen and the competence-activator substance in pneumococci. J. Bacteriol. 90, 1226-1232

249. TOMASZ, A. y HOTCHKISS, R.D. (1964) Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by a macromolecular cell products. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 480-487
250. TOMASZ, A. y MOSSER, J.L. (1966) On the nature of the pneumococcal activator substance. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 58-66
251. TOMASZ, A. y WESTPHAL, M. (1971) Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoid acid composition. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2627-2630
252. TOMASZ, A., WESTPHAL, M., BRILES, E.B. y FLETCHER, F. (1975) On the physiological functions of teichoic acids. J. Supramol. Struct. 3, 1-16
253. TOMASZ, A. y ZANATI, E. (1971) Appearance of a protein agglutinin on the spheroplast membrane of pneumococci during induction of competence. J. Bacteriol. 105, 1213-1215
254. TOMASZ, A, ZANATI, E. y ZIEGLER, R. (1971) DNA uptake during genetic transformation and the growing zone of the cell envelope. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1848-1852
255. TRAUTNER, T.A. y SPATZ, H.Ch. (1973) Transformation in Bacillus subtilis: En: Current Topics in Microbiology and Immunology vol. 62, pag. 61-88 Springer-Verlag. Berlin-New York.
256. VENEMA, G., PRITCHARD, R.H. y VENEMA-SCHRÖDER, T. (1965) Fate of transforming deoxyribonucleic acid in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89, 1250-1255
257. VERMEULEN, C.A. y VENEMA, G. (1971) Autoradiographic estimation of competence and the relationship between competence and transformability in cultures of Bacillus subtilis J. Gen. Microbiol. 69, 139-252
258. VERMEULEN, C.A. y VENEMA, G. (1974 a) Electron microscope and autoradiographic study of ultrastructural aspects of competence and deoxyribonucleic acid absorption in Bacillus subtilis: Ultrastructure of competent and noncompetent cells and cellular changes during development of competence. J. Bacteriol. 118, 334-341

259. VERMEULEN, C.A. y VENEMA, G. (1974 b) Electron microscope and autoradiographic study of ultrastructural aspects of competence and deoxyribonucleic acid absorption in Bacillus subtilis. Localization of uptake and of transport of trans-forming deoxyribonucleic acid in competent cells. J. Bacteriol. 118, 342-350
260. VOLL, M.J. y GOODGAL, S.H. (1961) Recombination during transformation in Haemophilus influenzae. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 505-512
261. VOLL, M.J. y GOODGAL, S.H. (1965) Loss of activity of trans-forming deoxyribonucleic acid after uptake by Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 90, 873-883
262. VOVIS, G.D. (1973) Adenosin triphosphate-dependent deoxyribonuclease from Diplococcus pneumoniae: Fate of trans-forming deoxyribonucleic acid in a strain deficient in the enzymatic activity. J. Bacteriol. 113, 718-723
263. WIEGAND, R.C., GODSON, G.N. y RADDING, C.M. (1975) Specificity of the S1 nuclease of Aspergillus oryzae. J. Biol. Chem. 250, 8848-8858
264. WILSON, G.A. y BOTT, K.F. (1968) Nutritional factors influencing the development of competence in the Bacillus subtilis transformation system. J. Bacteriol. 95, 1439-1449
265. WILSON, G.A. y BOTT, K.F. (1971) Use of transformation and transfection in Bacillus subtilis to characterize the mechanism of nalidixic acid inhibition. En: Informative molecules in biological systems. pag. 38-49 (Ed. L.G.H. Ledoux) North Holland. Publish. Co. Amsterdam.
266. WILSON, G.A. y YOUNG, F.E. (1972) Intergenetic transformation of the Bacillus subtilis genospecies. J. Bacteriol. 111, 705-716
267. WISE, E.M., ALEXANDER, S.P. y POWERS, M. (1973) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial transformation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 471-474
268. WORCEL, A. y BURGI, E. (1972) On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 82, 91-105
269. WORCEL, A., BURGI, E., ROBINSON, J. y CARLSON, C.L. (1974) Studies on the folded chromosome of Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 43-51

270. YOUNG, F.E. (1965) Variations in the chemical composition of the cell wall of Bacillus subtilis during growth in different media. Nature 207, 104-105
271. YOUNG, F.E. (1967) Competence in Bacillus subtilis transformation system. Nature 213, 773-775
272. YOUNG, F.E. y SPIZIZEN, J. (1961) Physiological and genetic factors affecting transformation of Bacillus subtilis J. Bacteriol. 81, 823-829
273. YOUNG, F.E. y SPIZIZEN, J. (1963) Biochemical aspects of competence in the Bacillus subtilis Transformation system. II. Autolytic enzyme activity of cell walls. J. Biol. Chem. 238, 3126-3130
274. YOUNG, F.E., SPIZIZEN, J. y CRAWFORD, I.P. (1963) Biochemical aspects of competence in the Bacillus subtilis transformation system. I. Chemical composition of cell walls. J. Biol. Chem. 238, 3119-3125
275. YOUNG, F.E., TIPPER, D.J. y STROMINGER, J.L. (1964) Autolysis of cell walls of Bacillus subtilis. Mechanism and possible relationship to competence. J. Biol. Chem. 239, 3600-3602
276. YOUNG, F.E. y WILSON, G.A. (1972) Genetics of Bacillus subtilis and other Gram-positive sporulating bacilli. En: Spores V pag. 77-106 (Eds. H.O. Halvorson, R. Hanson, y L.L. Campbell). Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
277. ZAMENHOF, S. (1957) Properties of the transforming principles. En: Chemical basis of heredity. pag. 351-377 (Eds. W.McElroy y B. Glass). John Hopkins Univ. Press. Baltimore Maryland.